

Humane Dendritische Zellen:
Identifizierung und funktionelle Charakterisierung
von neuen Oberflächenantigenen

Inaugural-Dissertation
Zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

Vorgelegt von

Andrzej Dzionek
aus Torun

Köln, 2003

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Ralf Küppers
Prof. Dr. Jens Brüning

Tag der mündlichen Prüfung: 18 November 2003

1 EINLEITUNG	7
2 MATERIALIEN UND METHODEN	16
2.1 Zellen	16
2.1.1 Aufreinigung von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut	16
2.1.2 Aufreinigung von Leukozyten aus dem peripheren Blut	16
2.1.3 Aufreinigung von mononukleären Zellen aus dem humanen Knochenmark	17
2.1.4 Vorbereitung einer Einzelzellsuspension aus entzündeten Tonsillen	17
2.2 Generierung von mAk mit der Spezifität für humane BDC	17
2.3 Magnetische Zellsortierung	18
2.3.1 Anreicherung von BDC	19
2.3.2 Anreicherung von CD1c ⁺ , BDCA-2 ⁺ und BDCA-3 ⁺ Zellen	19
2.3.3 Anreicherung von PDC	20
2.3.4 Anreicherung von PDC für die Identifizierung von BDCA-2 mittels Ausprägungsklonierung	20
2.3.5 Anreicherung von T Zellen, B Zellen, NK Zellen, Monozyten, CD11c ⁺ BDC und CD123 ⁺ PDC für die Analyse des Ausprägungsmusters von BDCA-2	20
2.3.6 Anreicherung von basophilen Granulozyten	21
2.3.7 Anreicherung von Monozyten, CD34 ⁺ hämatopoietischen Vorläuferzellen und CD3 ⁺ T Zellen	21
2.3.8 Anreicherung von naiven CD4 ⁺ T-Zellen	21
2.4 Kultivierung von Zellen	21
2.4.1 Generierung von imMo-DC und mMo-DC aus aufgereinigten CD14 ⁺ Monozyten	21
2.4.2 Generierung von DC aus aufgereinigten CD34 ⁺ hämatopoietischen Vorläuferzellen	22
2.4.3 Kultivierung von aufgereinigten BDC	22
2.4.4 Kultivierung von aufgereinigten PDC	22
2.4.5 Kultivierung von aufgereinigten CD1c ⁺ und BDCA-3 ⁺ BDC	23
2.4.6 Kultivierung von aufgereinigten naiven CD4 ⁺ T Zellen	23
2.4.7 Kokultur von aufgereinigten PDC und naiven CD4 ⁺ T Zellen	23
2.5 Durchflusszytometrische Analyse	24
2.6 Endozytostest	25
2.7 Mikroskopische Analyse	25
2.7.1 May Grünwald/Giemsa Färbung	25
2.7.2 Immunofluoreszente Färbung	26
2.8 Ausprägungsklonierung der BDCA-2 spezifischen cDNA	26
2.9 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) Analyse	27
2.10 Klonierung alternativer Spleißprodukte von BDCA-2	27
2.11 Immunopräzipitation	28
2.12 Western Blot Analyse	29

2.13	Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$)	29
2.14	Antigenpräsentation	30
2.15	ELISA (Engval, 1972)	31
3	ERGEBNISSE	32
3.1	Herstellung von mAk mit der Spezifität für Ag, die spezifisch auf humanen BDC ausgeprägt sind	32
3.1.1	Subtraktive Immunisierung	32
3.1.2	Bestimmung der Spezifität der Ak innerhalb der Leukozyten	34
3.1.3	Phänotyp von BDCA-2 ⁺ , BDCA-3 ⁺ und BDCA-4 ⁺ Zellen aus Knochenmark und entzündeten Tonsillen	40
3.1.4	Ausprägungsniveau von BDCA-2, BDCA-3 und BDCA-4 auf kultivierten BDC	44
3.1.5	Ausprägungsniveau von BDCA-2, BDCA-3 und BDCA-4 auf <i>in vitro</i> generierten dendritischen Zellen	46
3.2	Charakterisierung von CD1c ⁺ , BDCA-2 ⁺ /BDCA-4 ⁺ und BDCA-3 ⁺ BDC	47
3.2.1	Morphologie und Phänotyp	47
3.2.2	Ausprägungsniveau von MHC II, CD83 und kostimulatorischen Molekülen auf BDC nach Kultivierung	51
3.2.3	Antigenaufnahmekapazität	53
3.2.4	Stimulatorische Kapazität	54
3.3	Biochemische Charakterisierung von BDCA-2, BDCA-3 und BDCA-4 und Klonierung der kodierenden Gene	55
3.3.1	Immunopräzipitation	55
3.3.2	Identifizierung von BDCA-3 und BDCA-4 anhand tryptischer Spaltung	56
3.3.3	Identifizierung von BDCA-2 mittels Ausprägungsklonierung	57
3.4	Molekulare und funktionelle Charakterisierung von BDCA-2	59
3.4.1	Ausprägung der BDCA-2 mRNA in Geweben und Zellen aus dem Blut	59
3.4.2	Identifizierung der Spleißvarianten von BDCA-2	63
3.4.3	BDCA-2 vermittelte Ag-Aufnahme und Präsentation	65
3.4.4	Auswirkung der Bindung von AC144 mAk an BDCA-2 auf die $[Ca^{2+}]_i$ und die Tyrosin-Phosphorylierung intrazellulärer Proteine	68
3.4.5	Einfluss der Bindung von AC144 mAk an BDCA-2 auf die Sekretion von Zytokinen bei PDC	71
3.4.6	Auswirkung der Vorkultivierung von PDC in Gegenwart von anti-BDCA-2 mAk auf die IL-12 Produktion nach der anschließenden Stimulation mit CpG-DNA und CD40-Ligand.	75
3.4.7	Auswirkung der Bindung von AC144 mAk an BDCA-2 auf die Th-Zellpolarisation nach Stimulation mit allogenen PDC	77
4	DISKUSSION	83
4.1	Subtraktive Immunisierung	83
4.2	Ausprägungsmuster von CD1c, BDCA-2, BDCA-3 und BDCA-4 und Eigenschaften der einzelnen Subpopulationen von BDC	85
4.3	Molekulare Struktur und Funktion von BDCA-4	88

4.4 Molekulare Struktur und Funktion von BDCA-3	90
4.5 Eigenschaften von BDCA-2 und der Einfluß auf die Funktion von PDC	91
4.6 Funktion von BDCA-2	94
4.7 Die Relevanz von BDCA-2 in SLE	101
4.8 Ausblick	102
5 ZUSAMMENFASSUNG	104
6 LITERATURVERZEICHNIS	106

Abkürzungen

Ag	Antigen
AKB	Antikörper-Magnetpartikel
APC	Antigen-präsentierende Zellen
APC	Allophycozyanin
AS	Aminosäure
BDC	Blut-DC
BDCA	blood dendritic cell antigen
BMMNC	mononukleäre Zellen aus dem humanen Knochenmark
Bp	Basenpaare
BrdU	5-bromo-2-desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Ca ²⁺ -Konzentration
CpG-DNA	DNA-Oligonukleotide mit unmethylierten CpG Motiven
CRD	Kohlenhydraterkennungsdomäne
DC	dendritische Zellen
DCIR	DC Immunoreceptor
Dectin-2	DC-assoziiertes C-Typ Lektin
ds	Doppelstrang
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunosorbenstest
FITC 1	Fluoreszeinisothiozyanat Isomer 1
FLU	Influenza A/PR8 Virus
FSC	Vorwärtsstreulicht
HEV	Venolen mit hohem Endothel
IDC	interdigitierende dendritische Zellen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

imMo-DC	aus den Monozyten generierte unreife DC
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
lin	Linienspezifische Marker
LN	Lymphknoten
LY	Lucifer Yellow
MACS	magnetischer Zellsortierer
MALDI	matrix-assisted UV laser desorption/ionization
mAk	monoklonale Antikörper
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mMo-DC	aus den Monozyten generierte reife DC
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PDC	plasmazytoide DC
PE	R-Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll-Protein
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
Ram	Ratte anti-Maus
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLE	systemischer Lupus Erythematosus
ss	Einzelstrang
SSC	Seitwärtsstreulicht
TBE	Tris-Borat-EDTA
Th	T-Helferzellen

TLR	Toll-like Rezeptor
TOF	time of flight
U	Einheit
UTR	nicht translatierte Region
VEGF	vascular endothelial growth factor

1 Einleitung

Wenn pathogene Erreger (Viren, Bakterien, Parasiten) in den Organismus eindringen, kann dies Krankheiten oder sogar den Tod des Organismus zur Folge haben. Das Immunsystem der Wirbeltiere hat die Aufgabe, dieses zu verhindern, indem es Mikroben und andere Fremdstoffe spezifisch erkennt und neutralisiert. Man unterscheidet dabei grob zwischen Abwehrreaktionen, die auf der Bildung von Antikörpern (Ak) basieren (humorale Immunität) und zellulären Immunantworten, bei denen Ak nur eine untergeordnete Rolle spielen. Bei humoralen Immunantworten wird das fremde Antigen (Ag) durch die von B-Zellen sezernierten Ak gebunden und dadurch entweder neutralisiert, oder, wie im Fall von Mikroorganismen, opsonisiert und dadurch für die Phagozyten erkennbar gemacht. Mit Hilfe von membranständigen Ak kann das Ag von den B-Zellen auch direkt aufgenommen werden. Bei den zellulären Immunantworten spielen dagegen hauptsächlich die zytotoxischen T-Zellen und die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) eine wichtige Rolle. Diese Zellen sind im Stande, infizierte Zellen zu erkennen und sie zu lysieren. Die Selektion des jeweiligen Effektormechanismus wird von aktivierten T-Helferzellen (Th-Zellen) bestimmt und ist weitgehend von der Art des Pathogens abhängig.

Während die B-Zellen im Stande sind, natives Ag zu erkennen, werden von den T-Zellen nur kurze Peptide erkannt, die im Zusammenhang mit Haupthistokompatibilitätsmolekülen (MHC-Moleküle) auf den Ag-präsentierenden Zellen (APC) präsentiert werden (Romani et al., 1989; Germain et al., 1994; Brown et al., 1993; Carbone et al., 1989). Bei den APC, zu denen neben dendritischen Zellen (DC) auch Makrophagen und B-Zellen gehören, handelt es sich um Zellen, die Ag aus ihrer Umgebung aufnehmen und diese in spezialisierten Kompartimenten proteolytisch in kleine Peptide

spalten. Diese werden dann von den MHC-Molekülen der Klasse II gebunden und auf die Zelloberfläche gebracht.

Zu den am meisten spezialisierten APC gehören die DC, die kontinuierlich aus den CD34⁺ hämopoietischen Stammzellen im Knochenmark gebildet werden. Sie bilden eine heterogene Population und unterscheiden sich untereinander sowohl phänotypisch als auch funktionell. Im Laufe ihrer Entwicklung migrieren sie aus dem Knochenmark über das Blut in die peripheren Gewebe, wo sie zu einem Stadium differenzieren, in dem man sie als unreife DC bezeichnet. In diesem unreifen Stadium besitzen DC nur eine sehr geringe stimulatorische Kapazität, da sie die meisten Adhäsions- und kostimulatorischen Moleküle, wie CD40, ICAM-1, LFA-3, B7.1 und B7.2, nicht ausprägen. Das Hauptmerkmal von unreifen DC ist ihre Fähigkeit, extrazelluläre Ag aufzunehmen. Sie sind im Stande, Ag sowohl unspezifisch über Phagozytose (Inaba et al., 1993; Moll et al., 1993; Reis e Sousa et al., 1993) und Makropinozytose (Sallusto et al., 1995) als auch über spezifische Rezeptoren (Sallusto et al., 1994; Sallusto et al., 1995; Jiang et al., 1995) aufzunehmen. Im Gegensatz zu reifen DC prägen unreife DC nur wenig MHC Klasse II auf ihrer Oberfläche aus, besitzen aber auf der anderen Seite sogenannte MHC Klasse II-reiche Kompartimente, in denen MHC Klasse II-Moleküle gespeichert werden (Sallusto et al., 1994; Winzler et al., 1997; Nijman et al., 1995; Pierre et al., 1997). Kommt es zur Aktivierung, werden die MHC-Moleküle mit Peptiden beladen, die aus den aufgenommenen Ag generiert wurden, und auf die Zelloberfläche gebracht (Pierre et al., 1997; Cella et al., 1997). Gleichzeitig erhöht sich die Halbwertszeit von Oberflächen-MHC, so dass die DC das Ag viel effizienter präsentieren können. Dieser Prozess kann durch viele Faktoren ausgelöst werden. Dazu zählen unter anderem Bakterien (Winzler et al., 1997), Lipopolysaccharide (Verhasselt et al., 1997), Viren (Feldman et al., 1994) und Zytokine wie IL-1, GM-CSF und TNF- α (Koide et al., 1987; Kolenik et al., 1990; Josien et al., 1999). Die Aktivierung löst neben der erwähnten Verstärkung der Ag-Präsentation eine

Reihe von Veränderungen aus, die den Verlust der Ag-Aufnahmefähigkeit und die Erhöhung der stimulatorischen Kapazität zur Folge haben (Pure et al., 1990; Stossel et al., 1990; Sallusto et al., 1995). Zur gleichen Zeit migrieren DC aus dem Gewebe über die Lymphe in die sekundären lymphatischen Organe, wo sie sich entweder in der T-Zell-Region oder B-Zell-Follikel ansiedeln und jeweils T- und B-Zellen durch die Ausschüttung von Chemokinen anlocken (Adema et al., 1997) und stimulieren. Durch die Sekretion bestimmter Zytokine können DC an dieser Stelle auch die Art der Immunantwort, die sie in Gang setzen, grundlegend beeinflussen. Das von den DC sezernierte IL-12 p70 (Cella et al., 1996; Koch et al., 1996) induziert die Produktion von IFN- γ bei T-Zellen (Th1-Polarisierung), das sekretierte IL-4 dagegen veranlasst die T-Zellen selbst, IL-4 und IL-5 zu sezernieren (Th2-Polarisierung). IFN- γ aktiviert Makrophagen und induziert zusammen mit IL-12 p70 die Differenzierung von T-Zellen zu zytotoxischen Effektorzellen, wodurch eine zelluläre Immunantwort induziert wird. IL-4 und IL-5 induzieren wiederum jeweils die Aktivierung von Eosinophilen und die Antikörperproduktion bei B-Zellen.

Die Untersuchungen von humanen DC werden hauptsächlich durch den Mangel an geeignetem Gewebematerial und durch Probleme bei der Aufreinigung erheblich erschwert. Blut ist das einzige humane Gewebe, das in ausreichender Menge für Untersuchungen zur Verfügung steht. Aus diesem Grund sind DC aus dem humanen Blut (BDC) die am besten beschriebene Population und werden als HLA-DR⁺ CD3⁻ CD14⁻ CD19⁻ CD56⁻ definiert. Die genaue phänotypische Analyse dieser Zellen ergab, dass es sich bei den BDC nicht um eine homogene Population, sondern eher um eine Mischung aus mindestens zwei unterschiedlichen Subpopulationen handelt (O'Doherty et al., 1994; Kohrgruber et al., 1999; Robinson et al., 1999; Rissoan et al., 1999). Die erste dieser Populationen prägt CD123 (Rezeptor für IL-3) und CD45RA aus, ist CD11c⁻ und braucht zum Überleben und für die Differenzierung zu reifen DC IL-3. Aufgrund ihrer Morphologie, die sich durch eine runde Form, viel Zytoplasma und runde oder hantelförmige Kerne auszeichnet, werden

diese Zellen auch als plasmazytoide DC (PDC) bezeichnet (O'Doherty et al., 1994; Robinson et al., 1999; Grouard et al., 1997). Die zweite Population von BDC prägt nur wenig CD123 aus, ist CD11c⁺ und CD45RO⁺ und differenziert *in vitro* auch in Abwesenheit von exogenen Wachstumsfaktoren zu reifen DC. Die Morphologie dieser Zellen ist typisch für monozytoide Zellen und zeichnet sich durch granuläre Kerne und das Vorhandensein von kleinen Plasmafortsätzen, den sogenannten Dendriten (O'Doherty et al., 1994; Grouard et al., 1996).

Einige Eigenschaften von PDC, wie zum Beispiel die Ausprägung der prä-T-Zell-Rezeptor (TCR) α -Kette lassen vermuten, dass PDC sich aus lymphoiden Vorläufern entwickeln (Strobl et al., 1998; Rissoan et al., 1999), wogegen die CD11c⁺ BDC morphologisch und phänotypisch myeloiden Zellen ähneln (O'Doherty et al., 1994; Strobl et al., 1998; Kohrgruber et al., 1999). Beide Zellpopulationen werden auch in sekundären lymphatischen Organen gefunden, wo sie allerdings unterschiedliche Kompartimente besiedeln. Die PDC sind in den T-Zell-reichen Regionen von Lymphknoten (LN) präsent und wurden aus dem Grund früher auch als plasmazytoide T-Zellen bezeichnet (Lennert et al., 1975; Facchetti et al., 1988). Die CD11c⁺ BDC sind dagegen in der dunklen und hellen Zone von Keimzentren zu finden (Grouard et al., 1996). Im Blut befinden sich beide BDC-Populationen im unreifen Stadium und können nur sehr schwach naive T-Zellen stimulieren (O'Doherty et al., 1994). Ihre Reifung *in vitro* kann durch die Kultivierung in Gegenwart von IL-3 (PDC) bzw. ohne zusätzliche Zytokine (CD11c⁺ BDC) induziert werden. Obwohl BDC allgemein als unreif gelten, haben sie verglichen mit den aus CD14⁺ Monozyten *in vitro* generierten unreifen DC (imMo-DC) nur geringe Ag-Aufnahmekapazität (Dzionek et al., 2000). Es ist unklar, ob sie die Fähigkeit zur Ag-Aufnahme bereits verloren oder noch nicht erlangt haben. Es wäre denkbar, dass es sich bei diesen Zellen um eine Art Vorläufer- oder prä-DC und nicht um terminal differenzierte DC handelt (Rissoan et al., 1999; Spits et al., 2000; Blom et al., 2000; Kadowaki et al., 2001).

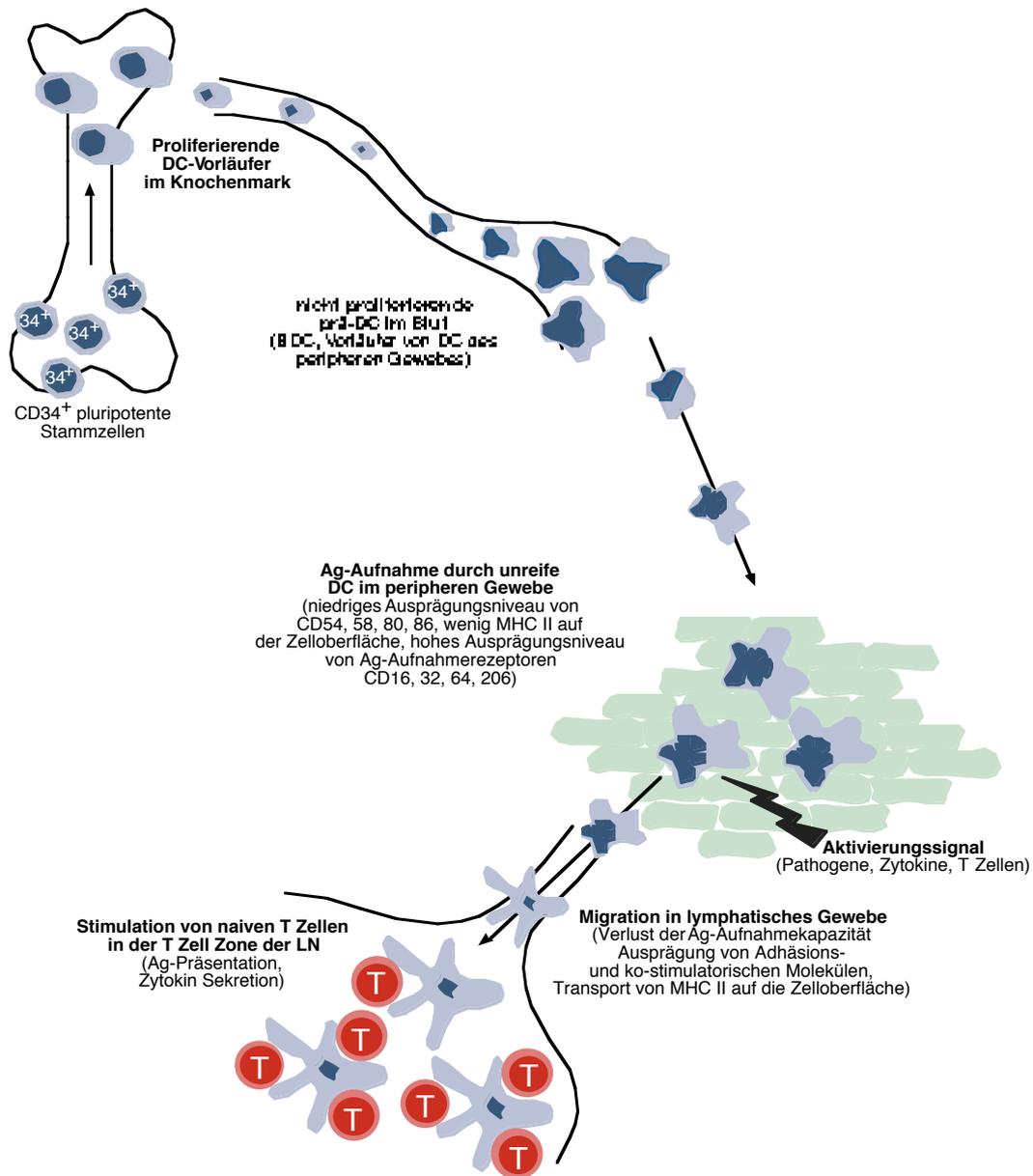


Abbildung 1.1: Entwicklung und Migration von DC. DC entstehen im Knochenmark aus CD34⁺ Stammzellen. Im unreifen Stadium (zum Teil noch als sogenannte prä-DC) wandern sie über die Blutbahn in periphere Gewebe, wo sie Ag aufnehmen. Nach der Aktivierung durch Krankheitserreger oder inflammatorische Zytokine wandern sie weiter in die sekundären lymphatischen Organe. Auf dem Weg dorthin verlieren sie die Ag-Aufnahmekapazität und regulieren gleichzeitig die Ausprägung von kostimulatorischen und Adhäsionsmolekülen hoch. In den LN angelangt, aktivieren sie T-Zellen, indem sie das aufgenommene Ag präsentieren.

Ebenso ist es unklar, ob sich die BDC auf dem Weg in die peripheren Gewebe befinden, oder ob es sich bei diesen Zellen um DC handelt, die im Blut nach

fremden Antigenen patrouillieren. Die Funktion der BDC-Populationen *in vivo* ist weitgehend unbekannt. Beide Populationen prägen unterschiedliche Ag-Rezeptoren aus und können daher Immunantworten gegen unterschiedliche Pathogene induzieren (Liu et al., 2001). Bei den Ag-Rezeptoren handelt es sich um Oberflächenmoleküle, die hochkonservierte pathogene Strukturen erkennen. Die Bindung des jeweiligen Ag an diese Rezeptoren kann entweder zur Internalisation des Ag oder zur Signaltransduktion führen, die wiederum die Aktivierung der DC oder die Modulation ihrer Funktion zur Folge haben kann. Zu den am besten beschriebenen Familien der Ag-Rezeptoren gehören die Toll-like-Rezeptoren (TLR) und die Lektine (Kadowaki et al., 2001; Figdor et al., 2002). Beide Klassen werden differenziell von den einzelnen DC-Populationen ausgeprägt. Zu den TLR gehören zur Zeit zehn Rezeptoren, die eine relativ breite Gruppe an Ag bakterieller und viraler Herkunft erkennen. Dazu gehören zum Beispiel Peptidoglykane (binden an TLR2), Lipopolysaccharide (binden an TLR4) und CpG-Oligodesoxynukleotide, die unmethylierte CpG-Motive enthalten (binden an TLR9). Die Lektine dagegen erkennen Kohlenhydratstrukturen auf unterschiedlichen Pathogenen, aber auch auf körpereigenen Glykoproteinen und können entweder die Ag-Aufnahme oder die Signalweiterleitung vermitteln (Mahnke et al., 2000; Geijtenbeek et al., 2000).

Das wichtigste Merkmal von PDC ist ihre Fähigkeit, große Mengen IFN- α/β zu sezernieren in Antwort auf: (a) virale Infektion (Perussia et al., 1985; Gobl et al., 1988; Kadowaki et al., 2000), (b) bakterielle Infektion (Svensson et al., 1996), (c) bakterielle DNA (Oligonukleotide), die unmethylierte CpG-Motive (CpG-DNA) beinhalten (Kadowaki et al., 2001; Bauer et al., 2001), (d) dsRNA (Bauer et al., 2001), (e) Serum von Patienten mit systemischen Lupus Erythematosus (SLE), das den IFN- α/β induzierenden Faktor (Komplexe aus DNA und anti-dsDNA Ak) enthält (Vallin et al., 1999), (f) Komplexe aus anti-dsDNA und nicht methylierter Plasmid-DNA, die den IFN- α/β induzierenden Faktor aus dem Serum von SLE-Patienten imitieren sollen (Vallin et al., 1999).

Aufgrund seiner antiproliferativen Wirkung als auch wegen der Tatsache, dass es im humanen System bei den Th-Zellen die Produktion von IFN- γ induziert, spielt IFN- α/β eine wichtige Rolle bei antiviralen Immunantworten (Cataldi et al., 1992; Brinkmann et al., 1993). Die PDC sind also sowohl an der angeborenen (durch die Sekretion von IFN- α/β) als auch an der adaptiven (durch die Stimulation von naiven T-Zellen) Immunantwort beteiligt (Kadowaki et al., 2000). Die Ausprägung bestimmter Ag-Rezeptoren wie TLR9 spricht weiterhin dafür, dass diesen Zellen auch eine Funktion bei antibakteriellen Immunantworten zugesprochen werden könnte (Krug et al., 2001; Kadowaki et al., 2001).

IFN- α/β hat auch eine große Relevanz bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen. In diesem Kontext wurde berichtet, dass Patienten nach einer IFN- α/β -Therapie oft autoreaktive Ak und in einigen Fällen Autoimmunerkrankungen entwickelt haben (Rönblom et al., 1991; Ioannou et al., 2000). Verantwortlich dafür ist wahrscheinlich die antiapoptotische Wirkung von IFN- α/β , die in einigen Fällen zum Überleben von autoreaktiven B-Zellen führen kann. Am Beispiel von SLE konnte gezeigt werden, dass die erhöhten IFN- α/β -Konzentrationen im Serum durch Komplexe aus autoreaktiven anti-dsDNA Ak und hypomethylierter DNA hervorgerufen werden (Cederblad et al., 1998; Vallin et al., 1999). Diese Komplexe stimulieren selektiv die IFN- α/β -Produktion in PDC. Obwohl die pathologische Kausalität in diesem Fall nicht ganz geklärt ist, scheinen die PDC durch die Sekretion großer Mengen von IFN- α/β nicht nur Krankheitserreger zu bekämpfen, sondern auch maßgeblich an der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen beteiligt zu sein.

Die wichtigsten Funktionen von DC, wie die Stimulation von naiven T-Zellen, Migration und Ag-Aufnahme, werden durch ihre Oberflächenmoleküle vermittelt. Um die Rolle der DC innerhalb des Immunsystems und die funktionellen Unterschiede zwischen den einzelnen DC-Subpopulationen

besser verstehen zu können, ist es notwendig, diese Moleküle genau zu erforschen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von neuen Oberflächenmarkern, die spezifisch auf den BDC ausgeprägt sind. Zwei Techniken, die in der Vergangenheit oft zur Identifizierung spezifisch ausgeprägter Gene angewandt wurden, sind die subtraktive Hybridisierung und das Differential Display (Liang et al., 1995). Mit diesen Methoden ist es möglich, Gene zu identifizieren, die von zwei unterschiedlichen Zellpopulationen differenziell transkribiert werden. Der klare Nachteil dieser Methoden bei der oben genannten Anwendung ist sowohl die fehlende Selektivität in Bezug auf Oberflächenmarker als auch die Tatsache, dass jeweils nur zwei bestimmte Zellpopulationen miteinander verglichen werden können. Demzufolge kann mit diesen Methoden nicht bestimmt werden, ob das jeweilige Molekül tatsächlich nur von der untersuchten Population ausgeprägt wird. Eine weitere Methode stellt die Generierung monoklonaler Ak (mAk) dar. Diese Methode verschafft den Vorteil, dass durch die Auswahl des Auslesesystems zum einen mAk selektiert werden können, die Oberflächenstrukturen erkennen, zum anderen kann die Spezifität des Ak viel schneller bestimmt werden. Die Nachteile dieser Methode liegen zum einen darin, dass das von dem Ak erkannte Ag erst kloniert werden muß und zum anderen, dass bei der Generierung von mAk gegen unbekannte Moleküle kein aufgereinigtes Ag zur Verfügung steht und somit ganze Zellen für die Immunisierung verwendet werden müssen. Da die BDC eine Reihe verschiedener, zum Teil hochimmunogener Ag ausprägen, die auch von anderen Zellen ausgeprägt werden, kann die gewünschte Immunreaktion von Immunantworten gegen diese Moleküle überlagert werden. Um dieses Problem zu umgehen, versuchte man in der Vergangenheit, Toleranz gegen die unerwünschten Ag zu induzieren. Die bekanntesten Methoden waren hier die Cyclophosphamid-Behandlung (Matthew et al., 1987; O'Doherty et al., 1993) und die neonatale Tolerisierung (Yamaguchi et al., 1995).

In dieser Arbeit wurde die erst vor kurzem beschriebene Methode der kontralateralen Immunisierung (Yin et al., 1997) angewandt. Diese Methode basiert auf der Tatsache, dass naive T- und B-Zellen sich in den LN ansiedeln, sobald sie ein Ag erkannt haben und aktiviert wurden (Kearney et al., 1994; Jacob et al., 1992; Ridderstad et al., 1998; Tarlinton et al., 1998). Durch die lokale Injektion von BDC-abgereicherten PBMC wird eine Abreicherung von dagegen reagierenden Lymphozyten in der Zirkulation erreicht und damit eine Art lokaler Toleranz in anderen Körperregionen induziert. Durch anschließende Injektion von BDC an einer anderen Stelle sollte es möglich sein, eine Immunantwort gegen BDC-spezifische Ag zu induzieren.

2 Materialien und Methoden

2.1 Zellen

Leukozytenreiches Blut (Buffy-Coats) von gesunden Patienten wurde vom Institut für Transfusionsmedizin des Krankenhaus Merheim (Köln, Deutschland) erhalten.

Leukapheresate von nicht mobilisierten Spendern wurden von der DRK-Blutspendezentrale Ulm (Ulm, Deutschland) erhalten.

2.1.1 Aufreinigung von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut

Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) wurden mit Hilfe der standardisierten Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Schweden) Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt. 50-75 ml Buffy-Coat von gesunden Blutspendern wurden 35 min bei 400 x g zentrifugiert. Die Leukozytenphase wurde anschließend großzügig abgenommen, mit PBS/EDTA auf 35 ml aufgefüllt und auf Ficoll-Paque geschichtet. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die sich in der Interphase befindenden PBMC abgenommen, mit PBS/EDTA auf 50 ml aufgefüllt und 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Um Thrombozyten abzureichern, wurden die Zellen ein weiteres Mal mit PBS/EDTA gewaschen (10 min, 200 x g).

2.1.2 Aufreinigung von Leukozyten aus dem peripheren Blut

Leukozyten aus dem peripheren Blut wurden aus dem Buffy-Coat aufgereinigt, indem die Erythrozyten in einem isotonischen Ammoniumchlorid-Puffer (155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 0,1 mM EDTA) lysiert wurden (10 min, Raumtemperatur (RT)). Die Leukozyten wurden anschließend mit PBS/EDTA gewaschen (10 min, 200 x g).

2.1.3 Aufreinigung von mononukleären Zellen aus dem humanen Knochenmark (BMMNC)

BMMNC wurden mittels der standardisierten Ficoll-Paque (Pharmacia) Dichtegradienten-Zentrifugation (siehe Kapitel 2.1.1) aus dem Knochenmark von gesunden Spendern aufgereinigt.

2.1.4 Vorbereitung einer Einzelzellsuspension aus entzündeten Tonsillen

Die Einzelzellsuspension aus entzündeten Tonsillen wurde vorbereitet, indem das tonsilläre Gewebe mit einem Skalpell vorsichtig zerkleinert und anschließend mit einem Stempel durch ein Sieb (100 μm Maschenweite; Becton Dickinson, San Jose, CA) gedrückt wurde.

2.2 Generierung von mAk mit der Spezifität für humane BDC.

Für die Immunisierung wurden fünf 6-8 Wochen alte Weibchen des Mausstammes BALB/c (Simonsen, Gilroy, CA) verwendet. An den Tagen 0, 4, 7, 11 und 14 wurden den Mäusen in die jeweils rechte hintere Pfote $\sim 5 \times 10^5$ bis 1×10^6 $\text{CD4}^+ \text{CD3}^- \text{CD11b}^- \text{CD16}^-$ BDC injiziert. In die linke hintere Pfote wurden an den Tagen -3, 0, 4, 7, 11 und 14 1×10^6 HLA-A2⁺ Bristol-8 B-Lymphoblastoma Zellen injiziert. Beide Zelltypen wurden vor der Injektion 10 min mit PHA (Titer 1:100; Life Technologies, Gaithersburg, MD) bei RT inkubiert und mit PBS gewaschen. Am Tag 15 wurden die Zellen aus den poplitealen LN der rechten hinteren Pfote mit SP2/0-Ag14-Zellen fusioniert. Fusionierte Zellen wurden in DMEM-Medium, das mit 20% FCS (HyClone, Logan, UT), 2 mM L-Glutamin, 15 mM HEPES, 10^{-7} M Hypoxanthin (Life Technologies) und 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Azaserin (O-diazoacetyl-L-Serin; Sigma, St. Louis, MO) versetzt war, aufgenommen und in 96-Loch-Zellkulturplatten (Corning Costar, Acton, MA) kultiviert.

Kulturüberstände aus den Löchern, in denen Hybridomkolonien gewachsen waren, wurden auf die Reaktivität der produzierten Ak gegenüber den PBMC

getestet. Eine Mischung aus PBMC und mit Ratte anti-Maus (Ram) κ mAk beschichteten Polystyrenpartikeln (2,5 μ m Durchmesser; Interfacial Dynamics, Portland, OR), wurde mit 50 μ l des Kulturüberstands 20 min bei RT inkubiert. Die Zell-Polystyrenpartikel-Mischung wurde anschließend zweimal mit PBS/EDTA/BSA gewaschen und der an die Partikel und Zellen gebundene Ak mit PE-konjugierten Ram IgG1 (RamG1) mAk (Klon X56; BD Biosciences, San Jose, CA), Ram IgG2 (RamG2) mAk (Klon X57; BD Biosciences) und Ram IgM (RamM) mAk (Klon X54; BD Biosciences) durchflusszytometrisch nachgewiesen.

Kulturüberstände, die sezernierten Ak enthielten (Färbung der Polystyrenpartikel) und nicht mehr als 5% der PBMC erkannten, wurden weiter auf ihre Reaktivität hinsichtlich BDC getestet. Vorangereicherte BDC (BDC-Reinheit von 5-10%; B-Zellen, T-Zellen und Monozyten wurden abgereichert) wurden mit 50 μ l des Kulturüberstands 20 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS/EDTA/BSA gewaschen und der an die Zellen gebundene Ak mit PE-konjugierten RamG1 mAk, RamG2 mAk und RamM mAk durchflusszytometrisch nachgewiesen. Um die HLA-DR⁺ BDC von den HLA-DR⁻ Zellen unterscheiden zu können, wurden die Zellen mit PBS/EDTA/BSA gewaschen, die freien Bindungsstellen von PE-konjugiertem RamG2 mAk mit 100 μ g/ml Maus IgG2a abgesättigt und mit FITC-konjugiertem Maus anti-human HLA-DR mAk (Klon AC122, IgG2a) gegengefärbt.

Hybridomzellen, die beide Testkriterien erfüllten, wurden expandiert, subkloniert und der Isotyp des Ak mit Hilfe von ISOTYPE Ab-STAT Kit (SangStat Medical, Palo Alto, CA) bestimmt.

2.3 Magnetische Zellsortierung

Zur Anreicherung bzw. Abreicherung von Zellen wurde das magnetische Zelltrennsystem MACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) verwendet. Hierbei werden Zellen direkt oder indirekt mit

superparamagnetischen Mikropartikeln, die an Ag oder AK gebunden sind, markiert (Miltenyi et al., 1990). So markierte Zellen werden von der Stahlkugelmatrix einer Trennsäule, die sich in einem Hochgradienten-Magnetfeld befindet, zurückgehalten. Alle nicht markierten Zellen können dagegen die Säule ungehindert passieren. Anschließend werden die markierten Zellen außerhalb des Magnetfeldes von der Säule eluiert.

2.3.1 Anreicherung von BDC

HLA-DR⁺, TCR $\alpha\beta$ ⁻, CD14⁻, CD19⁻, CD56⁻ BDC wurden isoliert, indem zuerst die T-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, und die B-Zellen mit Hilfe von mAk gegen CD3 (Klon BW264/56), CD11b (Klon M1/70.15.11.5), CD16 (Klon VEP-13) und in einigen Fällen einem weiteren mAk gegen ein undefiniertes Antigen, das von B-Zellen und Monozyten ausgeprägt wird (Klon L179; Becton Dickinson), indirekt abgereichert wurden. Die BDC wurden anschließend aus der abgereicherten (magnetisch negativen) Fraktion mit Hilfe von mAk gegen CD4 (Klon M-T321) direkt angereichert.

Zum Testen der Kulturüberstände von Hybridomzellen wurden BDC vorangereichert, indem T-Zellen, B-Zellen und Monozyten mit Hilfe von mAk gegen CD3 und das L179 Ag indirekt abgereichert wurden.

2.3.2 Anreicherung von CD1c⁺, BDCA-2⁺ und BDCA-3⁺ Zellen

CD1c⁺, BDCA-2⁺ und BDCA-3⁺ Zellen wurden indirekt aus den PBMC mit Hilfe von mAk gegen CD1c (Klon AD5-8E7), BDCA-2 (Klon AC144) und BDCA-3 (Klon AD5-5E8) angereichert. In einigen Fällen wurden BDCA-3⁺ Zellen mit Hilfe von mAk AD5-5E8 angereichert, der direkt an superparamagnetische Mikropartikel gekoppelt war. Hochreine CD1c⁺ BDC wurden angereichert, indem zuerst die kontaminierenden CD1c⁺ CD19⁺ B-Zellen mit Hilfe von mAk gegen CD19 (Klon SJ25-C1) abgereichert und anschließend die CD1c⁺ BDC mit Hilfe von anti-CD1c mAk (Klon AD5-8E7) angereichert wurden.

2.3.3 Anreicherung von PDC

Die PDC wurden mit Hilfe von mAk gegen BDCA-4 (Klon AD5-17F6; BDCA-4 Cell Isolation Kit, Miltenyi Biotec) direkt angereichert.

2.3.4 Anreicherung von PDC für die Identifizierung von BDCA-2 mittels Ausprägungsklonierung

Für die Identifizierung von BDCA-2 mittels Ausprägungsklonierung wurden PDC im großen Maßstab aus den Leukapheresaten von nicht mobilisierten Spendern mit Hilfe von mAk gegen BDCA-2 (Klon AC144) indirekt isoliert. Die Separation wurde mit Hilfe der klinisch zugelassenen immunomagnetischen Separationsvorrichtung (CliniMACS®, Miltenyi Biotec) durchgeführt.

2.3.5 Anreicherung von T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten, CD11c⁺ BDC und CD123⁺ PDC für die Analyse des Ausprägungsmusters von BDCA-2

Für die RT-PCR Analyse der BDCA-2 Ausprägung wurden T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und Monozyten jeweils mit Fluorochrom-konjugierten mAk gegen CD3 (Klon SK9, IgG2b; Becton Dickinson), CD19 (mAb 4G7, IgG1; Becton Dickinson), CD56 (Klon MY31, IgG1; Becton Dickinson) und CD14 (Klon MφP9, IgG2b; Becton Dickinson) markiert. Die Separation der Zellen erfolgte mittels eines FACSVantage™ (Becton Dickinson). Die CD11c⁺ BDC und die CD123⁺ PDC wurden isoliert, indem die PBMC mit mAk gegen CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56 (Lineage Cocktail 1; Becton Dickinson), HLA-DR (Klon L243, IgG2a; Becton Dickinson), CD11c (Klon S-HCL-3, IgG2b; Becton Dickinson) und CD123 (Klon 9F5, IgG1; Becton Dickinson) markiert wurden. Mittels FACSVantage™ (Becton Dickinson) wurden anschließend CD3⁻ CD14⁻ CD16⁻ CD19⁻ CD20⁻ CD56⁻ CD123⁻ HLA-DR⁺ CD11c⁺ bzw. CD3⁻ CD14⁻ CD16⁻ CD19⁻ CD20⁻ CD56⁻ CD11c⁻ HLA-DR⁺ CD123⁺ Zellen isoliert.

2.3.6 Anreicherung von basophilen Granulozyten

Basophile Granulozyten wurden angereichert, indem alle anderen Zellen mit Hilfe von mAk gegen CD3, CD7, CD14, CD15, CD36, CD45RA und HLA-DR indirekt abgereichert wurden (Basophil Isolation Kit, Miltenyi Biotec).

2.3.7 Anreicherung von Monozyten, CD34⁺ hämatopoietischen Vorläuferzellen und CD3⁺ T-Zellen

Monozyten, CD34⁺ hämatopoietische Vorläuferzellen und CD3⁺ T-Zellen wurden jeweils mit Hilfe von mAk gegen CD14 (Klon TÜK4, CD14 MicroBeads, Miltenyi Biotec), CD34 (Klon QBEND/10; Direct CD34 Progenitor Isolation Kit, Miltenyi Biotec) und CD3 (Klon OKT3; CD3 MicroBeads, Miltenyi Biotec) direkt angereichert.

2.3.8 Anreicherung von naiven CD4⁺ T-Zellen

Naive CD4⁺ T-Zellen wurden angereichert, indem alle anderen Zellen mit Hilfe von mAk gegen CD8, CD11b, CD16, CD19, CD36 und CD56 (CD4⁺ T Cell Isolation Kit, Miltenyi Biotec) indirekt abgereichert wurden. Um sicher zu stellen, dass keine CD45RO⁺ Gedächtnis-T-Zellen mit angereichert wurden, wurden bei der Abreicherung CD45RO MicroBeads (Miltenyi Biotec), zugegeben.

2.4 Kultivierung von Zellen

2.4.1 Generierung von imMo-DC und mMo-DC aus aufgereinigten CD14⁺ Monozyten

Für die Generierung von imMo-DC wurden aufgereinigte Monozyten sieben Tage bei einer Zellkonzentration von 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen/ml in Medium (RPMI 1640 (Life Technologies, Paisley, Großbritannien), 10% FCS (HyClone, Logan, UT), 2 mM L-Glutamin, 110 mg/ml Natrium-Pyruvat, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Life Technologies)) kultiviert, das mit

500-1000 U/ml rIL-4 (Pepro Tech, Rocky Hill, NJ) und 100 ng/ml rGM-CSF (Pepro Tech) versetzt war. Für die Generierung von mMo-DC wurden die unreifen DC gewaschen und weitere drei Tage in Medium mit 20 ng/ml rTNF- α (Pepro Tech) kultiviert.

2.4.2 Generierung von DC aus aufgereinigten CD34⁺ hämatopoietischen Vorläuferzellen

Aufgereinigte CD34⁺ hämatopoietische Vorläuferzellen wurden 11 Tage bei einer Zellkonzentration von 5×10^4 Zellen/ml in Medium kultiviert, das mit 100 ng/ml rFlt3-Ligand (Pepro Tech), 0,5 ng/ml rTGF- β 1 (Pepro Tech), 10 ng/ml rTNF- α (Pepro Tech), 20 ng/ml rSCF (Pepro Tech) und 100 ng/ml rGM-CSF (Pepro Tech) versetzt war.

2.4.3 Kultivierung von aufgereinigten BDC

Aufgereinigte CD4⁺ CD3⁻ CD14⁻ CD19⁻ CD56⁻ BDC wurden bis maximal 48 h bei einer Zellkonzentration von 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen/ml in Medium kultiviert, das mit 10 ng/ml rIL-3 (Pepro Tech) versetzt war.

2.4.4 Kultivierung von aufgereinigten PDC

Aufgereinigte PDC wurden bei einer Zellkonzentration von 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen/ml in Medium kultiviert, das mit 10 ng/ml rIL-3 (Pepro Tech) versetzt war. Für die jeweiligen Experimente wurden folgende Reagenzien zugegeben: (a) Influenza A/PR8-Virus (FLU, 5 Hämagglutinationseinheiten/ml), (b) anti-Einzelstrang (ss)/Doppelstrang (ds) DNA mAk (Klon MER-3 dialysiert gegen RPMI 1640, 2,5 μ g/ml; Serotec, Oxford, Großbritannien) plus Plasmid pcDNA3 (5 μ g/ml), (c) Serum von SLE-Patienten (Verdünnung 1/5, zur Verfügung gestellt von Falk Hiepe, Charité, Humboldt-Universität, Berlin, Deutschland), (d) CpG-DNA (ODN 2216; Krug et al., 2001), (e) anti-BDCA-2 mAk (Klon AC144, IgG1, 5 μ g/ml), (f) bestrahlte, CD40L transfizierte J558L-Zellen

(J558L-CD40L, Verhältnis 1/10), (g) Schaf anti-human IFN- α und IFN- β polyklonale Ak (Verdünnung 1/100), (h) rhIFN- α (100 ng/ml; Pepro Tech), (i) Lucifer Yellow (1mg/ml; Sigma).

2.4.5 Kultivierung von aufgereinigten CD1c⁺ und BDCA-3⁺ BDC

Aufgereinigte CD1c⁺ und BDCA-3⁺ BDC wurden bei einer Zellkonzentration von 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen/ml in Medium kultiviert. Für die jeweiligen Experimente wurden folgende Reagenzien zugegeben: (a) rIL-3 (10 ng/ml; Pepro Tech), (b) rIL-4 (20 ng/ml; Pepro Tech), (c) rGM-CSF (100 ng/ml; Pepro Tech).

2.4.6 Kultivierung von aufgereinigten naiven CD4⁺ T-Zellen

Aufgereinigte naive CD4⁺ CD45RA⁺ CD45RO⁻ T-Zellen wurden bei einer Zellkonzentration von 1×10^6 bis 2×10^6 Zellen/ml in Medium kultiviert. Alternativ wurde PMA (5 μ g/ml; Sigma) und Ionomycin (1 μ g/ml; Sigma) zugegeben.

2.4.7 Kokultur von aufgereinigten PDC und naiven CD4⁺ T-Zellen

Aufgereinigte PDC wurden bei einer Zellkonzentration von 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen/ml 24 h in Medium kultiviert, das mit 10 ng/ml rIL-3 (Pepro Tech) versetzt war. Anschließend wurden die PDC gewaschen, um rIL-3 zu entfernen und aufgereinigte naive CD4⁺ CD45RA⁺ CD45RO⁻ T-Zellen in einem Verhältnis von 1:10 (PDC:T-Zellen) zugegeben. Für die jeweiligen Experimente wurden folgende Ak während der Kokultur zugegeben: (a) anti-BDCA-2 mAk (Klon AC144, IgG1, 5 μ g/ml), (b) Schaf anti-human IFN- α und anti-IFN- β polyklonale Ak (Verdünnung 1/100), (c) anti-human IL-12 p70 (3 μ g/ml; BD Biosciences, San Diego, CA). Nach sechs Tagen Kultur wurde rIL-2 (20 Einheiten/ml; PeproTech) zugegeben, um die T-Zellproliferation zu induzieren.

2.5 Durchflusszytometrische Analyse

Für die durchflusszytometrische Multiparameteranalyse der Zellen wurde das Durchflusszytometer FACScalibur (BD Biosciences) verwendet. Pro Ansatz wurden zwischen 5×10^3 und 2×10^5 Zellen aufgenommen und mit Hilfe des CELLQuest™ Programms (BD Biosciences) analysiert.

Für die fluoreszente Markierung der Zellen wurden folgende Ak (Klon Name) benutzt: CD1a (HI149), CD10 (HI10a), CD11a (G43-25B), CD11c (B-ly6), CD25 (M-A261), CD27 (M-T271), CD32 (FL18.26), CD38 (HIT2), CD40 (5C3), CD43 (1G10), CD54 (HA58), CD62L (Dreg 56), CD64 (10.1), CD69 (FN50), CD98 (HIM6), anti-HLA-DQ (TÜ169) und anti-TCR $\alpha\beta$ (T10B9.1A-31) von PharMingen, San Diego, CA; CD2 (S5.2), CD8 (SK1), CD13 (L138), CD14 (MΦP9), CD19 (SJ25-C1), CD33 (P67.6), CD34 (8G12), CD45RO (UCHL-1), CD56 (NCAM16.2), CD62L (SK11), CD71 (L01.1), CD123 (9F5), anti-IgD (TA4.1), anti-Maus IgG1 (X56), anti-Maus IgG2 (X57) und anti-Maus IgM (X54) von BD Biosciences; CD5 (CLB-T11/1, 6G4), CD7 (CLB-T-3A1/1, 7F3), CD16 (CLB-FcR gran/1, 5D2), CD45RA (F8-11-13), CD80 (CLB-DAL1) von CLB, Amsterdam, Holand; CD18 (7E4), CD23 (9P25), CD58 (AICD58), CD77 (38.13), CD83 (HB15A), CD86 (HA5.2B7), CD116 (SC06) von Coulter-Immunotech, Marseille, Frankreich; CD3 (BW264/56), CD4 (M-T321), CD11b (M1/70.15.11.5), CD14 (TÜK4), CD15 (VIMC6), CD16 (VEP-13), anti-HLA-DR (910/D7), CD133 (AC133/1) und anti-TCR $\alpha\beta$ (BW242/412) von Miltenyi Biotec; CD36 (AC106), CD123 (AC145), anti-HLA-DR (AC122 und AC123) und anti-Glycophorin A (GPA)² (AC107) von AmCell, Sunnyvale, CA; CD1c (M241) von Ancell, Bayport, MN; polyklonal anti-IgG, anti-IgM (SA-DA4), polyklonal anti-kappa und polyklonal anti-lambda von Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Alabama; CD61 (VIPL2) von W. Knapp, Institut für Immunologie, Universität zu Wien, Wien, Österreich; CD44 (IM7) von J. Moll, Forschungszentrum Karlsruhe, Karlsruhe, Deutschland; CD20 (HI47) von Caltag Laboratories, Burlingame, CA; anti-CLA (HECA-452) von E. Butcher,

Department of Pathology, Stanford University, Stanford, CA; anti-Fc ϵ RI (15-1) von J. P. Kinet, Molecular Allergy and Immunology Section, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institute of Health, Rockville, Maryland; CD11c (Ki-M1) von M. R. Parwaresch, Department of Pathology, Christian Albrechts University, Kiel, Germany; CMRF-44 und CMRF-56 von D. N. Hart, Mater Medical Research Institute, Mater Misericordiae Hospitals, South Brisbane, Queensland, Australia; und anti-HLA-A,B,C (W6/32) von Sigma.

Alle Ak wurden als FITC-, PE-, Biotin- oder Cy5-Konjugate eingesetzt. Bei den indirekten Färbungen mit biotinylierten Ak wurde APC-konjugiertes Streptavidin verwendet (BD Bioscience). Die toten Zellen wurden aus der Analyse anhand der Färbung mit Propidiumjodid ausgeschlossen. Die Fc-Rezeptor (FcR) vermittelte Bindung wurde verhindert, indem die Zellen in Gegenwart von FcR blockierendem Reagenz (Miltenyi Biotec), das humanes IgG enthielt, gefärbt wurden.

2.6 Endozytose-Test

Aufgereinigte CD1c⁺, BDCA-2⁺ und BDCA-3⁺ BDC sowie CD3⁺ T-Zellen und imMo-DC wurden für 0, 15, 45 und 75 min in Medium kultiviert, das mit Lucifer Yellow (LY, 1 mg/ml; Sigma) versetzt war. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS/EDTA/BSA-Puffer gewaschen und die Menge an aufgenommenem Lucifer Yellow durchflusszytometrisch bestimmt.

2.7 Mikroskopische Analyse

2.7.1 May-Grünwald/Giemsa-Färbung

Aufgereinigte CD1c⁺, BDCA-2⁺ und BDCA-3⁺ BDC wurden auf Objektträger zentrifugiert (Zentrifuge Cytospin 3; Shandon, Pittsburg, PA) und das Cytoplasma und die Zellkerne mit Hilfe von May-Grünwald/Giemsa-Protokoll angefärbt. Die Analyse der Präparate erfolgte mittels eines inversen

Mikroskops (Axioskope; Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Die Bilder wurden mit Hilfe einer Digitalkamera aufgenommen (Microimager MI1400-12X; Xillix, Vancouver, Kanada).

2.7.2 Immunfluoreszente Färbung

Gefrierschnitte von humanen Tonsillen wurden 30 min bei RT in PBS/EDTA/2%FCS mit Hilfe von FITC-konjugierten mAk gegen BDCA-2 (Klon AC144, IgG1) und nicht konjugierten mAk gegen CD8, CD20, CD123 und HLA-DR (IgG2) gefärbt. Die nicht konjugierten mAk wurden im zweiten Schritt mit biotinyliertem anti-Maus IgG2 mAk und im dritten Schritt mit Texas Red-konjugiertem Streptavidin gefärbt. Zwischen den einzelnen Färbeschritten wurden die Präparate jeweils dreimal mit PBS/EDTA/2%FCS gewaschen. Die Analyse der Präparate erfolgte mittels eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (TCS SP2; Leica, Bensheim, Deutschland).

2.8 Ausprägungsklonierung der BDCA-2-spezifischen cDNA

Poly(A)⁺ RNA von aufgereinigten PDC wurde mit Hilfe von Oligo(dT)-Nukleotiden, die an superparamagnetische Mikropartikel gebunden waren, magnetisch aufgereinigt (μ MACS[®] mRNA Isolation Kit; Miltenyi Biotec). Die aufgereinigte mRNA wurde mit Hilfe von reverser Transkriptase (SuperScript II; Life Technologies, Paisley, Großbritannien) in cDNA umgeschrieben und in den pEF18SR-Vektor kloniert. Mit der cDNA-Bibliothek wurden COS1-Zellen transfiziert und BDCA-2 positive Klone mit Hilfe von mAk gegen BDCA-2 in mehreren Aufreinigungsrunden magnetisch (MACS[®]) und schließlich auch fluoreszent (FACS[®]) isoliert. Die Plasmid-DNA des BDCA-2⁺ Klons H4#10A wurde aufgereinigt und sequenziert. Die Homologiesuche erfolgte in der GenBank/EMBL/DDBJ Datenbank.

2.9 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)-Analyse

Für die RT-PCR-Analyse der Ausprägung von BDCA-2-mRNA in verschiedenen Zellpopulationen aus dem Blut wurden T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten, CD11c⁺ BDC und CD123⁺ PDC separiert und die Poly(A)⁺ RNA aufgereinigt (μ MACS[®] mRNA Isolation Kit; Miltenyi Biotec). Die Poly(A)⁺ RNA wurde anschließend mit Hilfe von SuperScript II reverser Transkriptase (Life Technologies) und Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer in die Erststrang-cDNA umgeschrieben. Für die RT-PCR-Analyse der Ausprägung von BDCA-2-mRNA in verschiedenen Geweben (Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskulatur, Niere, Bauchspeicheldrüse, Milz, Thymus, Prostata, Hoden, Eierstock, Dünndarm, Lymphknoten, Knochenmark, fötale Leber) wurden gewebsspezifische Erststrang-cDNA-Sätze (Human Multiple Tissue cDNA Panels I and II; CLONTECH Laboratories Inc., Palo Alto, CA) verwendet. Die Erststrang-cDNA wurde normiert anhand des Ausprägungsniveaus mehrerer Haushaltsgene (Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase, Phospholipase A₂, α -Tubulin und β -Aktin). Für die PCR-Reaktion wurden die DNA-Polymerase AdvanTaq Plus (CLONTECH Laboratories Inc.) und folgende Primer verwendet: 5'-TTG AAA GAA CCA CAC CCC GAA AGT-3' (Vorwärts-Primer) und 5'-TAG CTT TCT ACA ACG GTG GAT GCC-3' (Rückwärts-Primer). Die Bedingungen für die PCR-Reaktion wurden wie folgt gewählt: (a) Denaturierung: 30 s bei 94°C, (b) Hybridisierung und DNA-Synthese: 120 s bei 68°C, (c) Zahl der Zyklen: 34 oder 38. Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel elektrophoretisch größenfraktioniert, mittels Ethydiumbromid gefärbt und anschließend analysiert.

2.10 Klonierung alternativer Spleißprodukte von BDCA-2

Die Poly(A)⁺ RNA wurde aus PDC aufgereinigt und mit DNase I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) behandelt, um eine mögliche Verunreinigung mit genomischer DNA zu vermeiden. Die BDCA-2-spezifische

mRNA wurde anschließend mit Hilfe des Titan One Tube RT-PCR-Satzes (Roche) und Primer 5'-ACA CAA TGG TGC CTG AAG AAG-3' (Vorwärts-Primer) und 5'-ACA TTT TAG GGG CAT TCC TTG TA-3' (Rückwärts-Primer) in einer RT-PCR-Reaktion vervielfältigt. Die Bedingungen für die PCR-Reaktion wurden wie folgt gewählt: Die Proben wurden 10 min bei 25°C und 30 min bei 55°C inkubiert und anschließend wurden je nach Ansatz 20, 25 und 30 PCR-Zyklen durchgeführt: (a) Denaturierung: 30 s bei 94°C, (b) Hybridisierung: 45 s bei 57°C, (c) DNA-Synthese: 90 s bei 72°C. Die PCR-Produkte wurden auf einem 4-12% Tris-Borat-EDTA (TBE) Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch (PAGE) größenfraktioniert. Die einzelnen Banden wurden herausgeschnitten und die cDNA in einer weiteren PCR (30 Zyklen) unter identischen Bedingungen spezifisch vervielfältigt. Nach einer weiteren elektrophoretischen Größenfraktionierung wurden die Banden erneut herausgeschnitten und sequenziert.

2.11 Immunopräzipitation

Die Zelloberfläche der Zellen wurde mit Biotin (1 mg/ml in PBS, 15 min, RT) oder mit 1 mCi von Na¹²⁵I mittels Sulfosuccinimidyl-3-(4-Hydroxyphenyl) Propionat-Methode (Reid et al.,1990) markiert. Anschließend wurden die Zellen in Lysepuffer (1% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF (ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH), 10 µg/ml Aprotinin (ICN Biomedicals), 10 µg/ml Leupeptin (ICN Biomedicals)) lysiert. Die Lysate wurden über Nacht bei 4°C mit einem Überschuss an Protein G-Sepharose unter Rotation inkubiert, um Proteine abzureichern, die an Protein G-Sepharose binden. Der Ag-spezifische Ak wurde in einer Endkonzentration von 1-2 µg/ml zum Lysat zugegeben und 4 h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Die entstandenen Immunkomplexe wurden 1,5 h bei 4°C mit Protein G-Sepharose unter Rotation präzipitiert. Protein G-Sepharose wurde dreimal mit Lysepuffer und zusätzlich einmal mit Niedrigsalzpuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 15 mM NaCl) gewaschen, und die Immunkomplexe wurden mit

reduzierendem (+200 mM Dithiothreitol) oder nicht reduzierendem Laemmli-Protein-Probepuffer (63 mM Tris HCl, pH 6,8, 10% Glycerol, 2% SDS, 0,0025% Bromphenol Blau) 5 min bei 95°C eluiert. Die eluierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE größenfraktioniert, das Gel getrocknet und die radioaktive γ -Strahlung der ^{125}I markierten Proteine mit einem autoradiographischen Film (Amersham Pharmacia Biotec) 2-5 Tage detektiert. Im Fall von biotinylierten Proben wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, mit einem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat markiert und mittels Chemilumineszenz (enhanced chemiluminescence detection reagents (ECL); Amersham Pharmacia Biotec) sichtbar gemacht.

2.12 Western-Blot-Analyse

Aufgereinigte PDC, BDCA-2 transfizierte U937-Zellen und BDCA-2-transfizierte Jurkat-Zellen (jeweils 1×10^6) wurden für 2 min bei 37°C in Medium allein oder in Gegenwart von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-BDCA-2 mAk (Klon AC144, Maus IgG1) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in eiskaltem PBS gewaschen und in Laemmli-Protein-Probepuffer lysiert. Zellysate wurden sonifiziert, für 5 min bei 95°C inkubiert und mittels SDS-PAGE größenfraktioniert. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit 100 ng/ml Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase (HRP)), die an anti-Phosphotyrosin mAk (Klon PY20; Becton Dickinson) konjugiert war, markiert. Markierte Proteine wurden mittels ECL (Amersham Pharmacia Biotec) sichtbar gemacht.

2.13 Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)

Aufgereinigte PDC, U937-Zellen, Jurkat-Zellen, BDCA-2-transfizierte U937-Zellen und BDCA-2-transfizierte Jurkat-Zellen wurden 30 min bei 37°C in einer Konzentration von jeweils 1×10^6 Zellen/ml in Medium inkubiert, das mit 5 μM

Indo 1 (Sigma) versetzt war. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen und in frischem Medium resuspendiert. Unmittelbar vor der Messung der $[Ca^{2+}]_i$ wurde zu den Zellen anti-BDCA-2 mAk (Klon AC144, Maus IgG1) zugegeben. Wahlweise wurde Ziege anti-Maus IgG F(ab')₂ (Milan Analytica) als quervernetzender Ak und 4 mM EGTA zugegeben. Die Abhängigkeit der Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ von Protein-Tyrosin-Kinasen der src-Familie wurde untersucht, indem die Zellen vor der Messung 40 min mit 20 μ g/ml PP2 (Calbiochem) vorinkubiert wurden. Die Analyse erfolgte anhand des Verhältnisses der Emissionsintensitäten bei 405 nm (Ca²⁺-gebundene Form von Indo 1) und 525 nm (Ca²⁺-freie Form von Indo 1) mittels eines FACSVantage™ (Becton Dickinson).

2.14 Antigenpräsentation

30.000 Zellen des humanen, Maus-IgG1-spezifischen, CD4⁺ T-Zell-Klon B13 (Lanzavecchia et al., 1988) wurden in 96-Loch-Zellkulturplatten (Corning Costar, Acton, Massachusetts, USA) zusammen mit jeweils (a) 37.000, (b) 18.500, (c) 9.250, (d) 4.625, (e) 2.312, (f) 1.156 bestrahlten (3.000 Rad), aufgereinigten PDC kultiviert. Das Kulturmedium enthielt RPMI 1640 (Life Technologies), 10% FCS (HyClone), 2 mM L-Glutamin, 110 mg/ml Natrium-Pyruvat, 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin (Life Technologies) und 20 ng/ml des jeweiligen Maus-IgG1 mAk. Folgende mAk wurden eingesetzt: anti-BDCA-2 (Klon AC144; Maus-IgG1), anti-ILT3 (ZM3.8; Maus-IgG1), anti-Cytokeratin (Klon CK3-11D5; Maus-IgG1). Die Zellen wurden 48 h kultiviert und anschließend [³H] markiertes Thymidin zugegeben (1 μ Ci/96-er Loch). Die Zellen wurden weitere 16 h kultiviert und die Menge des eingebauten, radioaktiv markierten Thymidins gemessen.

2.15 ELISA (Engval, 1972)

Die Konzentrationen von sezerniertem humanem IL-8, IL-12 p70, TNF- α und IFN- α in den Kulturüberständen wurden mittels eines spezifischen ELISA bestimmt. ELISA-Platten (Greiner, Solingen, Deutschland) wurden mit folgenden primären Ak beschichtet: (a) anti-IL-8 (Klon 893A6G8; Biosource, Nivelles, Belgien), (b) anti-IL-12 p70 (Klon 20C2; BD Biosciences), (c) anti-TNF- α (Klon 68B2B3/68B6A3; Biosource), (d) anti-IFN- α (IFN- α module set BMS216MST; MedSystems Diagnostics, Wien, Österreich). Freie Bindungsstellen wurden mit BSA abgesättigt und anschließend mit den Zellkulturüberständen inkubiert. Für die spätere Konzentrationsbestimmung wurde jeweils der entsprechende Zytokin-Standard in definierter Konzentration inkubiert. Die Detektion der gebundenen Zytokine erfolgte mit Hilfe folgender biotinkonjugierter Ak: (a) anti-IL-8 (Klon 790A28G2; Biosource), (b) anti-IL-12 p40/p70 (Klon C8.6; BD Biosciences), (c) anti-TNF- α (Klon 68B3C5; Biosource), (d) anti-IFN- α (IFN- α module set BMS216MST; MedSystems). Die Proben wurden anschließend mit Streptavidin-konjugierter Meerrettichperoxidase (Boehringer Mannheim) inkubiert und die Menge der gebundenen Cytokine anhand einer Farbreaktion ermittelt, bei der 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (Pierce, Rockford, IL) als Substrat diente. Die Farbreaktion wurde durch die Zugabe von 10%iger Schwefelsäure (H₂SO₄) gestoppt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm mittels eines Thermo Max ELISA-Platten-Photometers (MWG-Biotech, High Point, NC) gemessen.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung von mAk, die spezifisch humane BDC erkennen.

3.1.1 Subtraktive Immunisierung

Für alle Immunisierungsversuche wurden BDC von gesunden Spendern verwendet. In fünf Immunisierungsversuchen wurden jeweils fünf 6-8 Wochen alte Balb/c-Mäuse parallel immunisiert. Für die Fusion wurden Zellen aus den poplitealen LN des jeweils rechten hinteren Beines verwendet. Die Spezifität der Ak wurde in einer Zwei-Schritt-Strategie bestimmt. Im ersten Schritt wurden Klone aussortiert, deren Ak gegen mehr als 5% der PBMC reaktiv waren und auch die, die keine Ak produziert hatten. Um beide Informationen in einem Schritt zu erhalten, wurden Latexpartikel mit Ram κ beschichtet. Die beschichteten Partikel wurden mit PBMC gemischt, mit dem Hybridomüberstand inkubiert und anschließend mit PE-konjugierten RamG1-PE, RamG2ab-PE und RamM-PE indirekt gefärbt. Bei diesem Schritt wurde der Verlust von Ak mit Lambda-Kette in Kauf genommen. Die Färbung der Partikel zeigte, ob der jeweilige Klon Ak produziert, wogegen die Färbung der PBMC eine vorläufige Auskunft über die Spezifität des Ak lieferte. Die verbliebenen Klone wurden im zweiten Schritt auf ihre Spezifität gegenüber den BDC untersucht. Vorangereicherte BDC (Reinheit von 10-20%) wurden mit dem Hybridomüberstand inkubiert und anschließend mit RamG1-PE, RamG2ab-PE und RamM-PE indirekt gefärbt. Um die Färbung den HLA-DR⁺ BDC eindeutig zuordnen zu können, wurden die Zellen zusätzlich mit FITC-konjugierten anti-HLA-DR mAk (HLA-DR-FITC) gefärbt. Die Bindung von HLA-DR-FITC (Maus-IgG2a) an die freien Bindungsstellen von RamG2ab-PE und Ram κ auf den Latexpartikeln wurde durch Vorinkubation mit einer sättigenden Konzentration eines irrelevanten Maus-IgG2a Ak verhindert. Von über 2000 untersuchten Klonen haben ca. 50 die Kriterien beider Tests erfüllt. In der

Abbildung 3.1 ist die Zwei-Schritt-Strategie anhand der durchflusszytometrischen Analyse einiger ausgewählter Klone dargestellt.

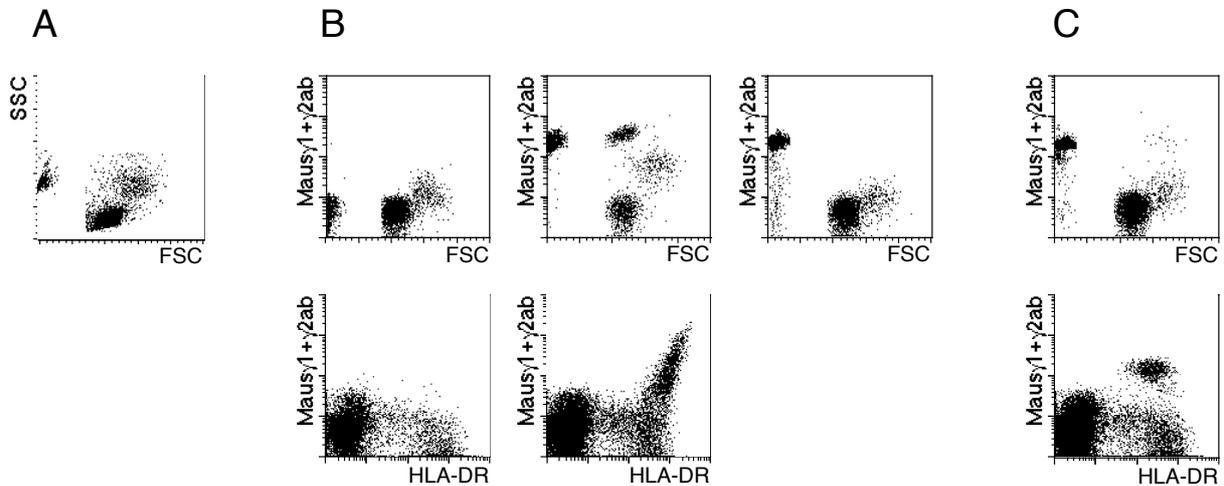


Abbildung 3.1: Strategie zur Testung der Ak-Spezifität. (A) Streulicht-Eigenschaften von Latexpartikeln (Population am linken Rand des Punktediagramms) und PBMC (in der Mitte des Punktediagramms). Latexpartikel sind kleiner als PBMC und können anhand ihrer Vorwärtstreulicht-Eigenschaften (FSC) von PBMC unterschieden werden. (B, obere Reihe) Dargestellt sind drei Beispiele für die Reaktivität der sezernierten Ak im ersten Schritt der Spezifitätstestung (von links nach rechts): kein Maus-IgG1, IgG2a oder IgG2b befindet sich im Überstand (weder Latexpartikel noch PBMC werden gefärbt); der sezernierte Ak gehört der Klasse IgG1, IgG2a oder IgG2b (Latexpartikel werden gefärbt) und erkennt eine signifikante Population innerhalb der PBMC (mehr als 5%); der sezernierte Ak gehört der Klasse IgG1, IgG2a oder IgG2b an und erkennt keine signifikante Population innerhalb von PBMC. (B, untere Reihe) Dargestellt sind zwei Beispiele für die Reaktivität der sezernierten Ak im zweiten Schritt der Spezifitätstestung (von links nach rechts): Ak erkennt keine PBMC; Ak erkennt eine signifikante Population von HLA-DR⁺ BDC. (C) Dargestellt ist durchflusszytometrische Analyse der Spezifitätstestung am Beispiel von anti-BDCA-2 mAk AC144: erster Schritt (obere Reihe), zweiter Schritt (untere Reihe).

3.1.2 Bestimmung der Spezifität der Ak innerhalb der Leukozyten

Sieben der ca. 50 mAk, die Kriterien beider Tests (siehe Kapitel 2.2) erfüllt haben, sind in der Tabelle 3.1 aufgelistet. Ihre genaue Spezifität wurde anschließend in den nachfolgenden Experimenten bestimmt.

Tabelle 3.1: mAk mit der Spezifität für BDC

Ag	Ak	Epitop	Isotyp	CD11c ⁺⁺ CD123 ^{+/-} BDC	CD11c ⁺ CD123 ⁻ BDC	CD11c ⁻ CD123 ⁺⁺ BDC	andere Leukozyten
CD1c	AD5-8E7	1A	IgG2a	+	-	-	B-Zellen
BDCA-2	AC144	2A	IgG1	-	-	+	-
BDCA-2	AD5-13A11	2A	IgG2a	-	-	+	-
BDCA-2	AD5-4B8	2A	IgG1	-	-	+	-
BDCA-3	AD5-5E8	3A	IgG1	-	+	-	-
BDCA-3	AD5-14H12	3B	IgG1	-	+	-	-
BDCA-4	AD5-17F6	4A	IgG1	-	-	+	-

Anhand der Färbung von Leukozyten konnten die Klone in vier unterschiedliche Gruppen unterteilt werden: 1) AC144, AD5-13A11, AD5-4B8; 2) AD5-17F6; 3) AD5-5E8, AD5-14H12; 4) AD5-8E7. Die mAk der ersten Gruppe (AC144, AD5-13A11, AD5-4B8) erkannten eine kleine Population ($0,41 \pm 0,17\%$; $n=10$) innerhalb der PBMC (Abbildung 3.2 A, obere Reihe). Diese Population zeigt sich sehr homogen im Bezug auf die Größe und die Oberflächenbeschaffenheit der Zellen (Abbildung 3.2 B (b)). Die durchflusszytometrische Analyse ergab zusätzlich, dass diese Zellen keines der linienspezifischen (lin) Ag TCR $\alpha\beta$ (T-Zellen), CD14 (Monocyten), CD19 (B-Zellen) und CD56 (NK-Zellen) ausprägen (Abbildung 3.2 A).

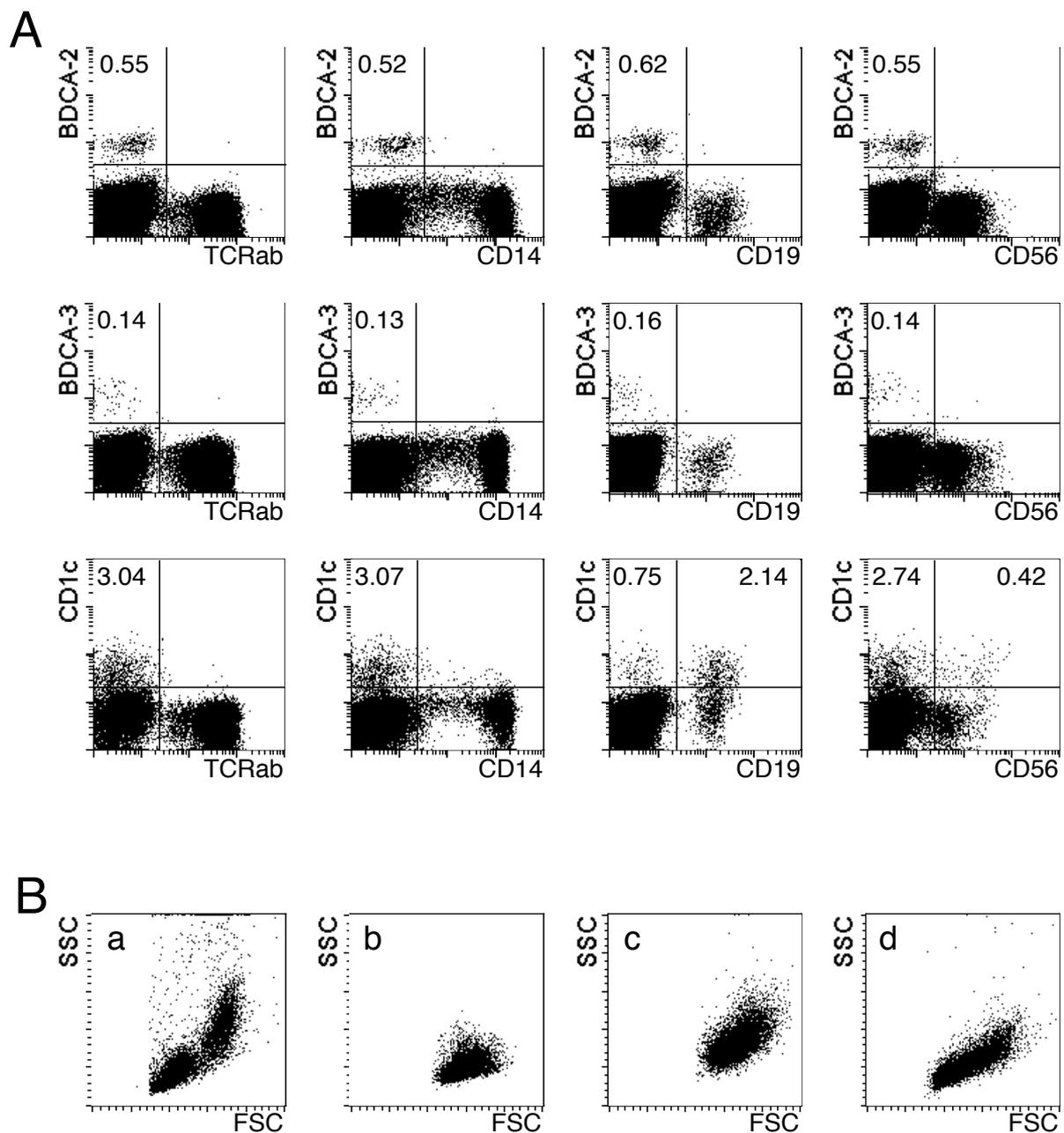


Abbildung 3.2: Ausprägung von BDCA-2, BDCA-3 und CD1c (BDCA-1) auf PBMC. (A) Färbung von PBMC mit FITC-konjugierten mAk gegen BDCA-2 (AC144), BDCA-3 (AD5-5E8) und CD1c (AD5-8E7) und mit PE-konjugierten mAk gegen das TCR $\alpha\beta$ -Heterodimer, CD14, CD19 und CD56. Die Zahlen zeigen den prozentualen Anteil an Zellen in dem jeweiligen Quadranten. Tote Zellen wurden anhand der Propidiumjodid-Färbung und ihrer Streulichteigenschaften von der Analyse ausgeschlossen. (B) Streulichteigenschaften von PBMC (a), BDCA-2⁺ BDC (b), BDCA-3⁺ BDC (c) und CD1c⁺ Zellen (d).

Die Spezifität gegenüber BDC wurde anhand der Färbung von aufgereinigten HLA-DR⁺, TCR $\alpha\beta$ ⁻, CD14⁻, CD19⁻, CD56⁻ Zellen bestimmt. Diese humanen DC bilden keine homogene Population, sondern können mit Hilfe von CD11c- und CD123-Färbung in drei unterschiedliche Subpopulationen unterteilt werden: 1) CD11c⁻ CD123⁺⁺ PDC, 2) CD11c⁺⁺ CD123^{+/-} myeloide DC und 3) CD11c⁺ CD123⁻ myeloide DC (Abbildung 3.3, obere Reihe, rechtes Punktediagramm). Die mAk aus der ersten Gruppe färben alle CD11c⁻ CD123⁺⁺, aber nur sehr wenige CD11c⁺ Zellen. Bei den gefärbten CD11c⁺ Zellen handelt es sich eindeutig nicht um die myeloiden DC, wie mit Hilfe von CD123- und CD1c-Gegenfärbungen gezeigt werden konnte. Die durch die mAk aus der ersten Gruppe gefärbten PDC sind, im Gegensatz zu den CD11c⁺ CD123⁻ BDC, alle CD123⁺. Die CD11c⁺⁺ CD123^{+/-} BDC dagegen prägen alle das Ag CD1c aus (Dzionic et al., 2000), das auf den PDC nicht nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3.3). Um festzustellen, ob die mAk aus der ersten Gruppe ein einziges Ag erkennen, wurden Kointernalisations- und Kreuzinhibitionsexperimente durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass alle Ak dieser Gruppe an ein Epitop desselben Ag binden (Ergebnisse nicht gezeigt; Tabelle 3.1). Das Ag wurde blood dendritic cell antigen-2 (BDCA-2) genannt.

Der mAk AD5-17F6 aus der zweiten Gruppe erkennt innerhalb der frisch aufgereinigten PBMC die gleichen Zellen wie die Ak der ersten Gruppe (Abbildungen 3.2 A und 3.4). Bei dem von AD5-17F6 erkannten Ag handelt es sich jedoch nicht um BDCA-2, wie mit Hilfe von Kointernalisationsexperimenten und Färbung von BDCA-2 transfizierten Zelllinien gezeigt werden konnte. Die AD5-17F6-Färbung zeigt die gleiche Intensität vor und nach der anti-BDCA-2 vermittelten Internalisation von BDCA-2, wogegen die BDCA-2 Färbung nicht mehr nachweisbar ist (Ergebnisse nicht gezeigt). Zusätzlich färbt AD5-17F6 die BDCA-2 transfizierten U937-Zellen nicht und zeigt ein komplett anderes Färbemuster

auf kultivierten und *in vitro* generierten DC (siehe Kapitel 3.1.4 und 3.1.5). Das Ag, an das der mAk AD5-17F6 bindet, wurde BDCA-4 genannt.

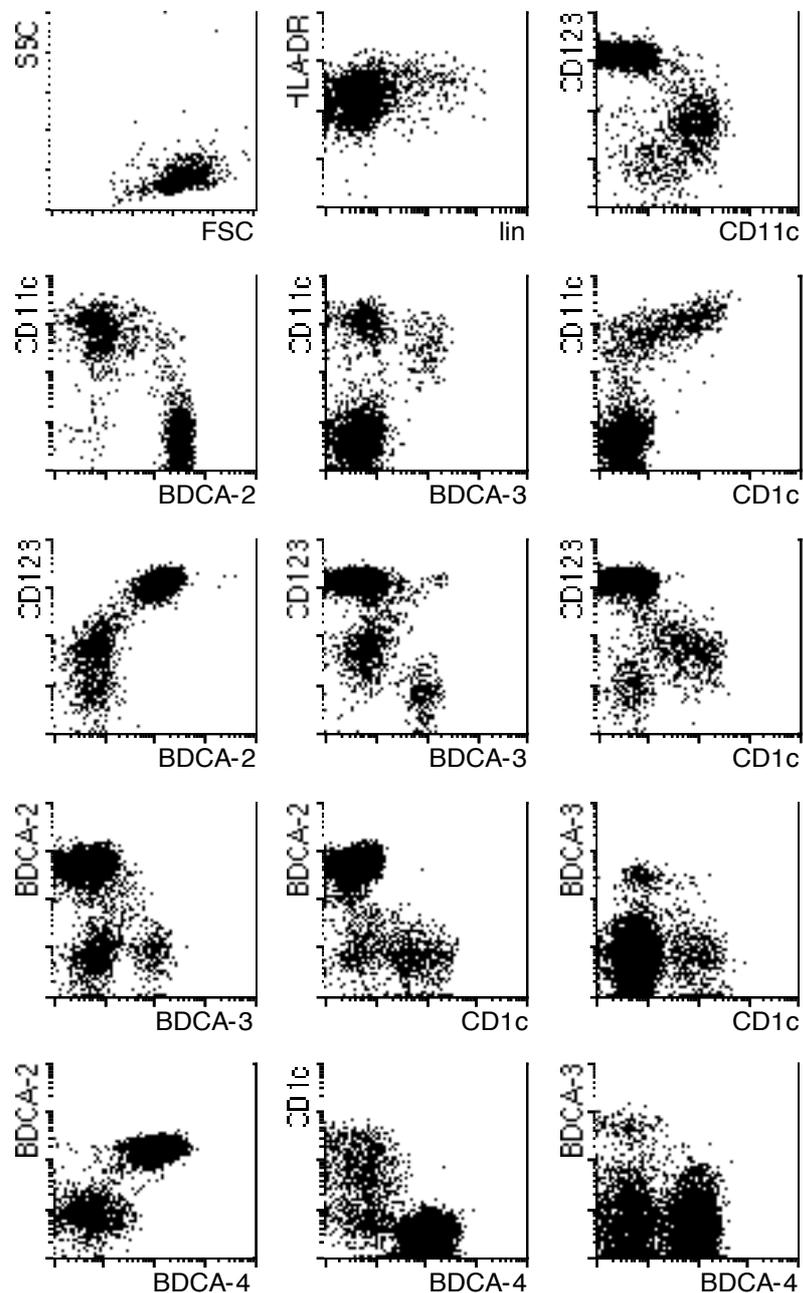


Abbildung 3.3: BDCA-2, BDCA-3, BDCA-4 und CD1c (BDCA-1) werden von unterschiedlichen Subpopulationen von BDC ausgeprägt. BDC wurden aus PBMC isoliert, indem zuerst CD3⁺, CD11b⁺ und CD16⁺ Zellen abgereichert und anschließend CD4⁺ BDC angereichert wurden. Die Reinheit der aufgereinigten BDC ist anhand der Streulichteigenschaften (oberes linkes Fenster) der Zellen und der Färbung mit anti-HLA-DR-Cy5 und anti-lin-FITC (anti-TCR $\alpha\beta$, CD14, CD19, CD56; oberes mittleres Fenster)

demonstriert. Die einzelnen BDC-Populationen sind charakterisiert anhand der Ausprägung von CD123 und CD11c: 1) CD11c⁻ CD123⁺⁺, 2) CD11c⁺⁺ CD123^{+/-}, 3) CD11c⁺ CD123⁻ (oberes rechtes Fenster). Die Spezifität der Ausprägung von BDCA-2, BDCA-3, BDCA-4 und CD1c auf den BDC wurde anhand von Färbungen von BDCA-2, BDCA-3, BDCA-4, CD1c, CD123 und CD11c bestimmt. BDCA-2, BDCA-3, BDCA-4 und CD1c sind jeweils nur von einer Subpopulation der BDC ausgeprägt.

Die Antikörper der dritten Gruppe (AD5-5E8 und AD5-14H12) färben $0,04 \pm 0,01\%$ (n=10) der PBMC. Je nach Qualität des Färbekongjugates konnten auch Monozyten, CD11c⁻ CD123⁺⁺ PDC und CD11c⁺⁺ CD123^{+/-} myeloide DC mit den oben genannten mAk angefärbt werden. Diese Zellen erscheinen homogen in Bezug auf ihre Größe und die Oberflächenbeschaffenheit, und genau wie die BDCA-2⁺ PDC prägen sie keines der lin-Ag (TCR $\alpha\beta$, CD14, CD19, CD56) aus (Abbildung 3.2 A). Der Größe nach zu urteilen, handelt es sich bei diesen Zellen weder um Lymphozyten noch um Monozyten, wobei sie etwas größer als die BDCA-2⁺ Zellen sind (Abbildung 3.2 B (c)). Die Färbung von aufgereinigten BDC ergab, dass es sich bei diesen Zellen um eine kleine Subpopulation myeloider CD11c⁺ CD123⁻ BDC handelt. Anhand von Doppelfärbungen, Kocapping- und Kreuzinhibitionsexperimenten erscheint es plausibel, dass beide mAk zwei unterschiedliche Epitope desselben Ag erkennen. Dies wurde im späteren Teil dieser Arbeit bestätigt, nachdem das Gen identifiziert wurde, das für das oben genannte Ag kodiert (siehe Kapitel 3.3.2). Dabei wurde gezeigt, dass mit diesem Gen stabil transfizierte Zelllinien im Gegensatz zu den nicht transfizierten Zellen mit beiden mAk gefärbt werden konnten. Die Färbung der transfizierten Zelllinien mit einer sättigenden Konzentration eines der mAk konnte allerdings die Färbung mit dem anderen mAk nicht inhibieren (Ergebnisse nicht gezeigt). Das von den mAk erkannte Ag wurde BDCA-3 genannt.

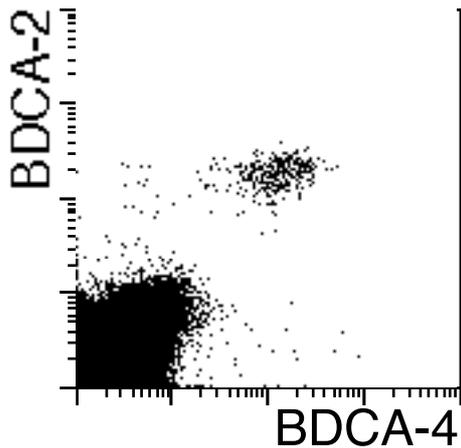


Abbildung 3.4: Ausprägung von BDCA-4 auf PBMC. Gezeigt ist eine Färbung mit FITC-konjugiertem mAk gegen BDCA-2 (AC144) und PE-konjugiertem Ak gegen BDCA-4 (AD5-17F6).

Der mAk AD5-8E7 aus der dritten Gruppe erkennt $2,39 \pm 0,76\%$ ($n=10$) der PBMC. Die Analyse der Größe, der Oberflächenbeschaffenheit, als auch die Färbung gegen die lin-Ag ergaben, dass AD5-8E7 einen Teil der B-Lymphozyten, jedoch keine T-Lymphozyten und keine Monozyten erkennt (Abbildung 3.2 A). Unter den aufgereinigten BDC wurden die $CD11c^{++} CD123^{+/-}$ BDC gefärbt (Abbildung 3.3). Ein beträchtlicher Teil dieser Zellen prägt auch den NK-Zell-Marker CD56 aus. Weitere phänotypische Untersuchungen zeigten, dass es sich bei den $CD11c^{++} CD123^{+/-} CD56^{+}$ Zellen nicht um die NK-Zellen handelt. Diese prägen nämlich neben CD56 unter anderen auch den Fc-Rezeptor CD16 aus, der von den oben genannten BDC nicht ausgeprägt wird (Tabelle 3.2). Das von dem mAk AD5-8E7 erkannte Ag wurde zuerst BDCA-1 genant. Spätere Untersuchungen zeigten, dass AD5-8E7 die Bindung des anti-CD1c mAk M241 (Ancell) an die MOLT-4-Zelllinie komplett inhibiert (Abbildung 3.5). Bei dem Ag, das von AD5-8E7 erkannt wird, handelt es sich demnach um CD1c. Keiner der in der Tabelle 3.1 aufgelisteten mAk erkannte Granulozyten, Blutplättchen, Erythrozyten, Basophile, oder aufgereinigte, $CD34^{+}$ hämatopoietische Vorläuferzellen (Ergebnisse nicht gezeigt).

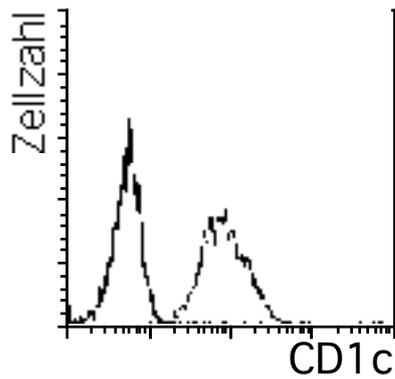


Abbildung 3.5: Der BDCA-1-spezifische mAk AD5-8E7 inhibiert die Bindung des anti-CD1c mAk M241 an die MOLT-4-Zellen. Die MOLT-4-Zellen wurden mit einer sättigenden Konzentration von mAk AD5-8E7 (dicke Linie) bzw. Kontroll mAk des gleichen Isotyps (dünne Linie) vorinkubiert und anschließend mit PE-konjugiertem anti-CD1c mAk M241 gefärbt.

3.1.3 Phänotyp von BDCA-2⁺, BDCA-3⁺ und BDCA-4⁺ Zellen aus dem Knochenmark und entzündeten Tonsillen

Die immunofluoreszente Analyse von BMMNC aus gesunden Spendern ergab, dass alle Zellen mit dem für PDC typischen Phänotyp sowohl BDCA-2 als auch BDCA-4 auf ihrer Oberfläche ausprägen (Abbildung 3.6 A und B). Ungleich der Situation im Blut prägt eine kleine Subpopulation dieser Zellen weniger BDCA-2 und CD45RA aus. Die gleiche Subpopulation prägt auch den Stammzellmarker CD34, aber nicht den Stammzellmarker CD133 aus. Die Färbung von BMMNC mit dem anti-BDCA-3 mAk AD5-5E8 zeigte, dass es im Knochenmark, genau wie im Blut, mehrere Populationen gibt, die BDCA-3 ausprägen. Die kleine Population mit der stärksten Ausprägung von BDCA-3 (Abbildung 3.6 C (R1)) entspricht phänotypisch den BDCA-3⁺ BDC. Außerdem wird BDCA-3 zusätzlich von CD14⁺ Monozyten und von BDCA-2⁺ PDC schwach ausgeprägt. Dabei prägt die BDCA-2^{+/-} CD45RA^{+/-} CD34⁺ Subpopulation von PDC weniger BDCA-3 als die BDCA-2⁺ PDC aus (Abbildung 3.6 C).

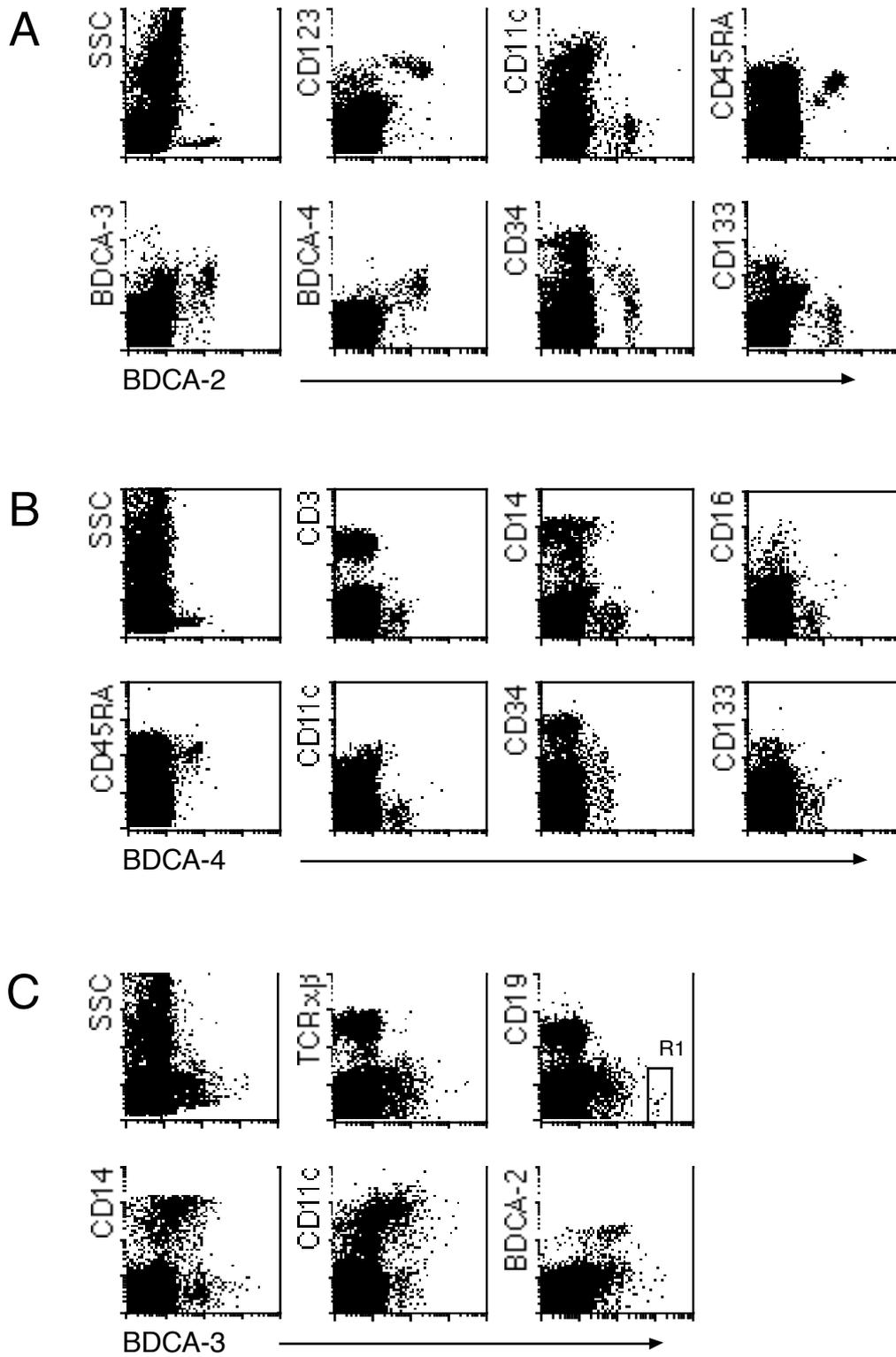


Abbildung 3.6: Phänotyp von BDCA-2⁺ (A), BDCA-4⁺ (B) und BDCA-3⁺ (C) Zellen innerhalb von BMMNC. Das Ausprägungsmuster von BDCA-2, BDCA-4 und BDCA-3 innerhalb der BMMNC ist identisch mit dem der PBMC, mit Ausnahme einer kleinen Subpopulation von PDC, die BDCA-2 und CD45RA schwach ausprägt und positiv für den Stammzellmarker CD34 ist. Das Fenster R1 enthält CD11c⁺ CD123⁻ BDC.

In entzündeten Tonsillen zeigen BDCA-2 und BDCA-4 unterschiedliche Ausprägungsmuster. Während BDCA-2 nur von CD123⁺ PDC ausgeprägt wird (Abbildung 3.7), ist BDCA-4 auch auf einer kleinen Subpopulation von CD3⁺ T-Zellen und auf wenigen CD3⁻ BDCA-2⁻ Zellen schwach detektierbar (Abbildung 3.8 A).

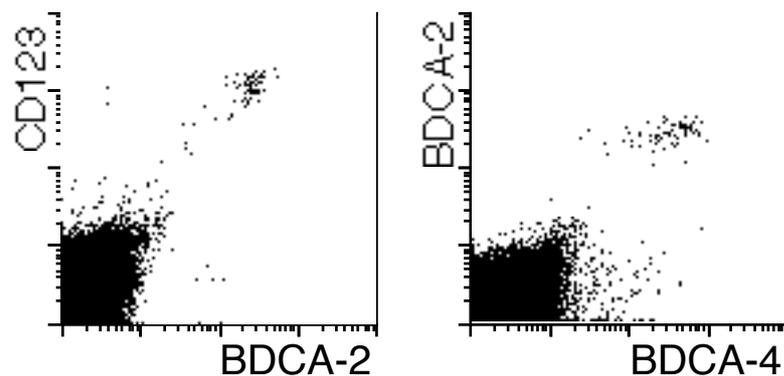


Abbildung 3.7: In entzündeten Tonsillen wird BDCA-2 von CD123⁺ BDCA-4⁺ PDC ausgeprägt. Zellen aus entzündeten Tonsillen wurden mit anti-BDCA-2-FITC, CD123-PE und anti-BDCA-4-APC gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Alle BDCA-2⁺ Zellen sind CD123⁺ und BDCA-4⁺.

CD3⁺ BDCA-4⁺ T-Zellen zeigen einen Phänotyp, der charakteristisch für folliculäre B-Helfer-Gedächtnis-T-Zellen (T_{FH}-Zellen) ist: (1) sie gehören dem CD4⁺ Th-Kompartiment an, (2) sie prägen CD27, CD28 und CD45RO, aber kein CD45RA aus, (3) sie prägen den frühen Aktivierungsmarker CD69 aus, aber keinen der späteren Aktivierungsmarker CD71, CD25 und HLA-DR, (d) sie prägen unterschiedliche Mengen an CD62L und ein Teil von ihnen CD57 aus (Abbildung 3.8 B).

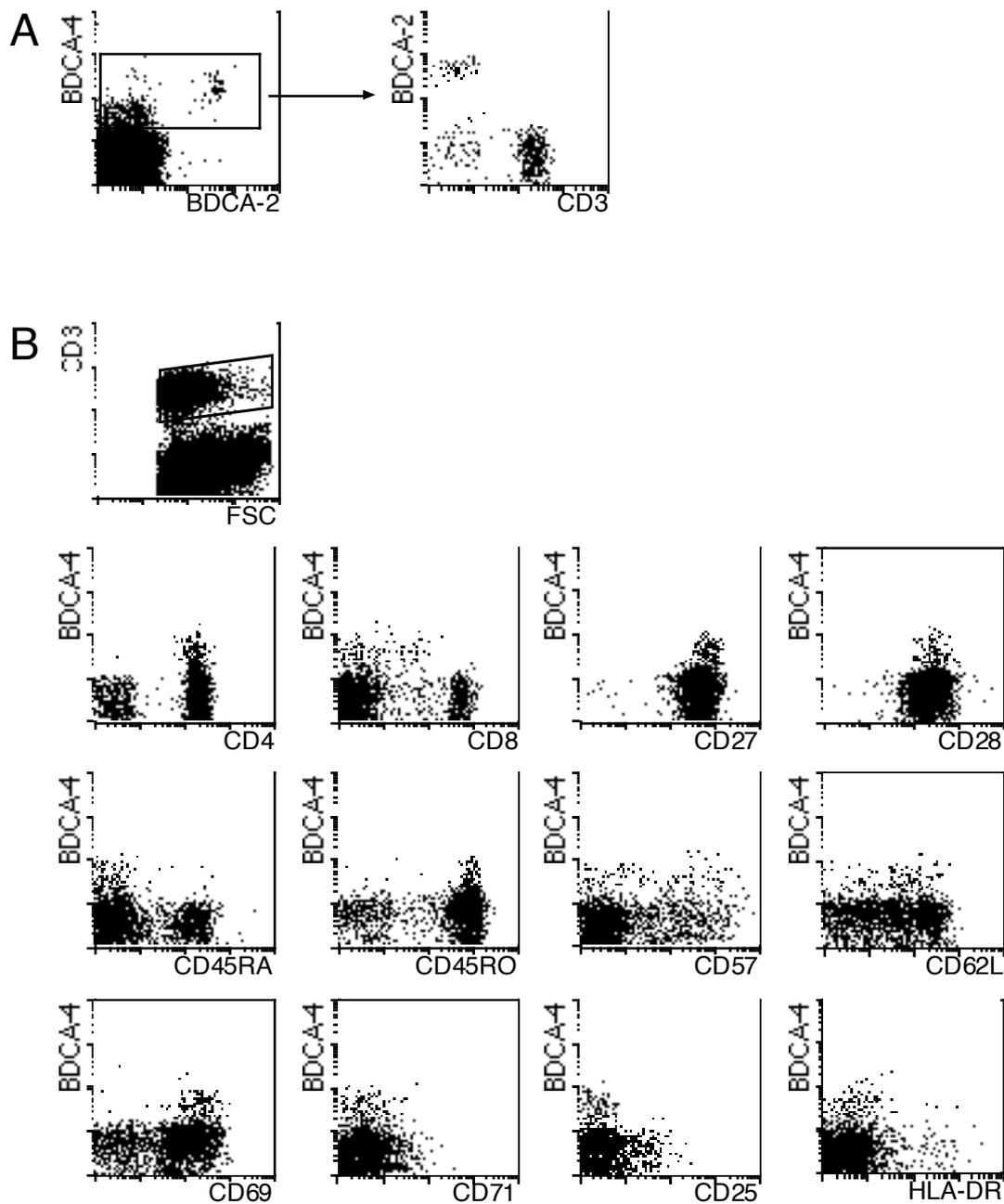


Abbildung 3.8: Ausprägung von BDCA-4 auf PDC und CD57⁺ T_{FH}-Zellen in entzündeten Tonsillen. (A) Tonsilläre Zellen wurden mit anti-BDCA-4, anti-BDCA-2 und CD3 gefärbt. BDCA-4⁺ Zellen wurden anschließend hinsichtlich ihrer CD3 und BDCA-2 Ausprägung analysiert. BDCA-4 wird von BDCA-2⁺ PDC, CD3⁺ T-Zellen und einigen wenigen BDCA-2⁻ CD3⁻ Zellen ausgeprägt. (B) Tonsilläre Zellen wurden mit anti-BDCA-4, CD3 und mAk gegen eine Reihe weiterer Leukozytenmarker gefärbt. Analysiert wurde das Ausprägungsniveau der einzelnen Leukozytenmarker auf CD3⁺ BDCA-4⁺ Zellen. Die meisten

CD3⁺ BDCA-4⁺ T-Zellen zeigen einen T_{FH}-Zell-spezifischen Immunphänotyp: CD25⁻ CD45RA⁻ CD71⁻ HLA-DR⁻ CD57⁺ CD62L⁺ CD4⁺ CD27⁺ CD28⁺ CD45RO⁺ CD69⁺.

3.1.4 Ausprägungsniveau von BDCA-2, BDCA-3 und BDCA-4 auf kultivierten BDC

DC erfüllen in Abhängigkeit von ihrem Reifungs- bzw. Aktivierungszustand unterschiedliche Funktionen. Demzufolge werden viele Ag, wie z.B. Ag-Aufnahmerezeptoren oder kostimulatorische Moleküle, nur temporär von ihnen ausgeprägt. Dabei bestimmt das Ag-Ausprägungsmuster die Funktion dieser Zellen. Von daher könnte man je nach Zeitraum, in dem das jeweilige Ag ausgeprägt wird, Rückschlüsse auf seine mögliche Funktion ziehen. Aus diesem Grund war es wichtig, die Ausprägungskinetiken von BDCA-2, BDCA-3 und BDCA-4 im Laufe der Entwicklung der einzelnen Populationen von BDC zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden aufgereinigte BDC mit IL-3 kultiviert und das Ausprägungsniveau von BDCA-2, BDCA-3 und BDCA-4 zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt (Abbildung 3.9).

Die Ausprägung von BDCA-2 auf CD11c⁻ PDC wurde innerhalb von 48 Stunden komplett runterreguliert. BDCA-4 wurde dagegen auf CD11c⁻ PDC hochreguliert und im Gegensatz zu BDCA-2 auf den meisten, wenn nicht allen, CD11c⁺ BDC neu ausgeprägt. Die Ausprägung von BDCA-3 auf CD11c⁻ PDC wurde hochreguliert, wobei das Maximum nach etwa 24 Stunden erreicht wurde. Nach dieser Zeit nahm das Ausprägungsniveau von BDCA-3 wieder ab. Bei den BDCA-3⁺ CD11c⁺ BDC waren keine Veränderungen in der Ausprägung von BDCA-3 während der ersten 6 Stunden zu beobachten. Bei den BDCA-3⁻ CD11c⁺⁺ BDC dagegen wurde BDCA-3 innerhalb der ersten 3 Stunden bereits auf einigen Zellen hochreguliert. Eine weitere Untersuchung der Ausprägungskinetik war nicht möglich, da beide Zellpopulationen (BDCA-3⁻ CD11c⁺⁺ und BDCA-3⁺ CD11c⁺) mit Hilfe einer BDCA-3/CD11c-Doppelfärbung nicht mehr eindeutig definiert werden konnten. Betrachtet man alle CD11c⁺ Zellen, so zeigt die Ausprägungskinetik von BDCA-3 ein ähnliches Bild wie

schon bei den CD11c⁻ BDC. Auch hier erreicht die Ausprägung nach 24 Stunden ihr Maximum und nimmt anschließend wieder ab.

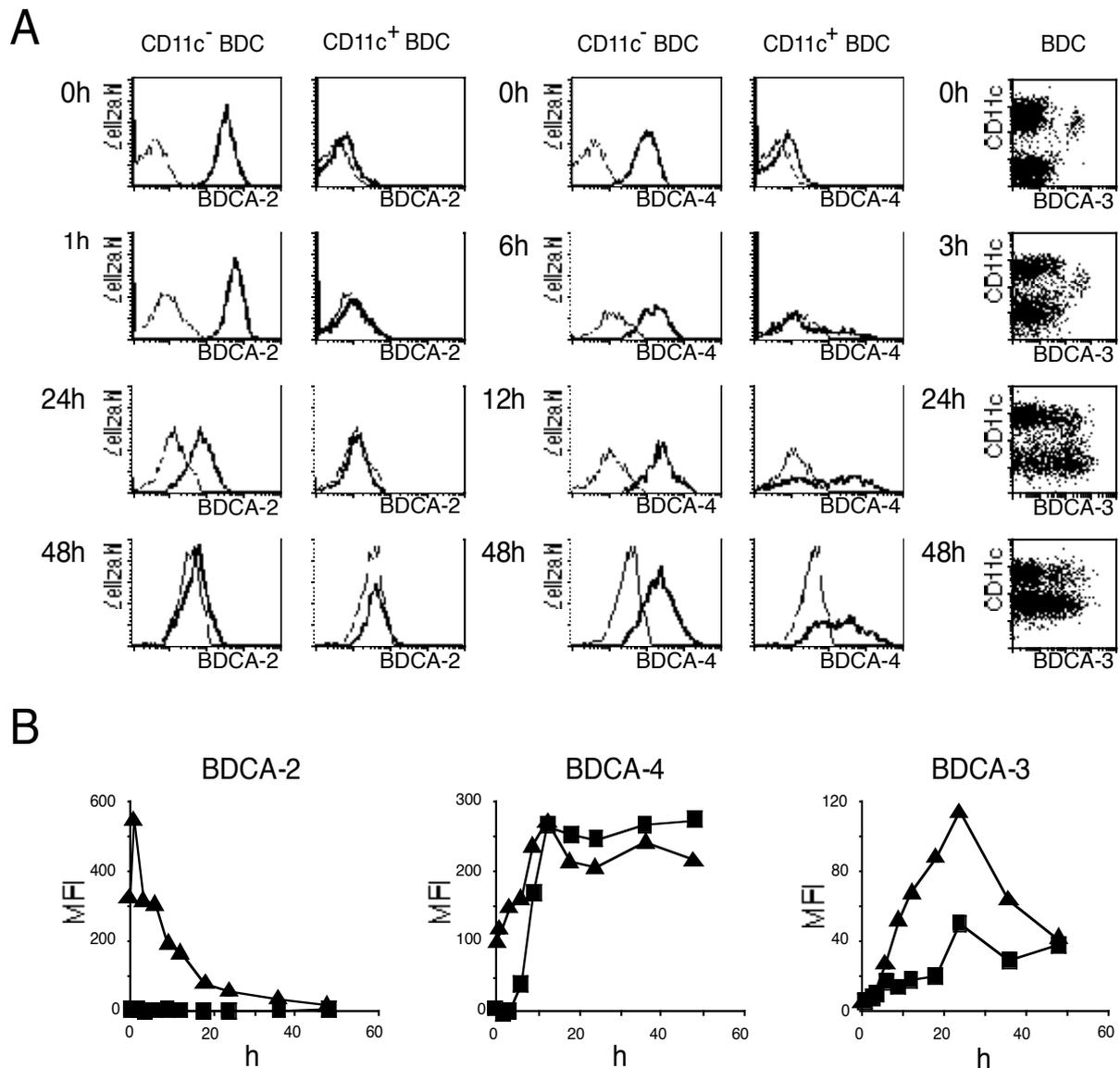


Abbildung 3.9: Ausprägungsniveau von BDCA-2, BDCA-3 und BDCA-4 auf aufgereinigten BDC nach Kultivierung in Gegenwart von IL-3. (A) Die Histogramme zeigen eine Färbung von jeweils CD11c⁻ und CD11c⁺ BDC mit PE-konjugiertem anti-BDCA-2 mAk (AC144) und anti-BDCA-4 mAk (AD5-17F6; jeweils dicke Linie) und PE-konjugiertem irrelevantem mAk gleichen Isotyps (dünne Linie) nach 0 bis 48 Stunden Kultivierung in Gegenwart von IL-3. Die Punktdiagramme zeigen eine Färbung mit CD11c-PE und anti-BDCA-3-Biotin/Streptavidin-APC. **(B)** Die Diagramme zeigen die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Färbung mit anti-BDCA-2-PE und anti-BDCA-4-PE mAk und

anti-BDCA-3-Biotin/Streptavidin-APC von CD11c⁻ (▲) und CD11c⁺ (■) BDC. Die MFI-Werte für die BDCA-2- und BDCA-4-Färbung wurden erhalten, indem die Werte der Kontrollfärbung mit dem irrelevanten mAk von den Werten der Färbung mit den mAk AC144 und AD5-17F6 subtrahiert wurden. Bei der BDCA-3-Färbung wurden die Autofluoreszenzwerte (nicht gefärbte Probe) von den MFI-Werten der Färbung mit dem mAk AD5-5E8 subtrahiert.

3.1.5 Ausprägungsniveau von BDCA-2, BDCA-3 und BDCA-4 auf *in vitro* generierten dendritischen Zellen

In den letzten Jahren wurden mehrere Zytokine identifiziert, die die *in vitro*-Reifung von DC aus Vorläuferzellen induzieren. CD14⁺ Monozyten, die mit GM-CSF und IL-4 kultiviert wurden, differenzieren zu effizienten APC mit einem Ag-Ausprägungsmuster, das typisch für unreife DC ist (Sallusto et al., 1994; Romani et al., 1994; Pickl et al., 1996). Auch CD34⁺ hämatopoietische Vorläuferzellen differenzieren zu funktional unreifen DC, wenn sie mit Flt3-Ligand, TGF-β1, TNF-α, SCF und GM-CSF kultiviert werden (Caux et al., 1992). Phänotypisch werden diese Zellen über die Ausprägung von CD1a charakterisiert. Wie man der Abbildung 3.10 entnehmen kann, prägen beide Arten von *in vitro* generierten, unreifen DC die Oberflächenmarker CD1a, CD1c und BDCA-4 aus, wogegen BDCA-2 und BDCA-3 nicht nachgewiesen werden konnten.

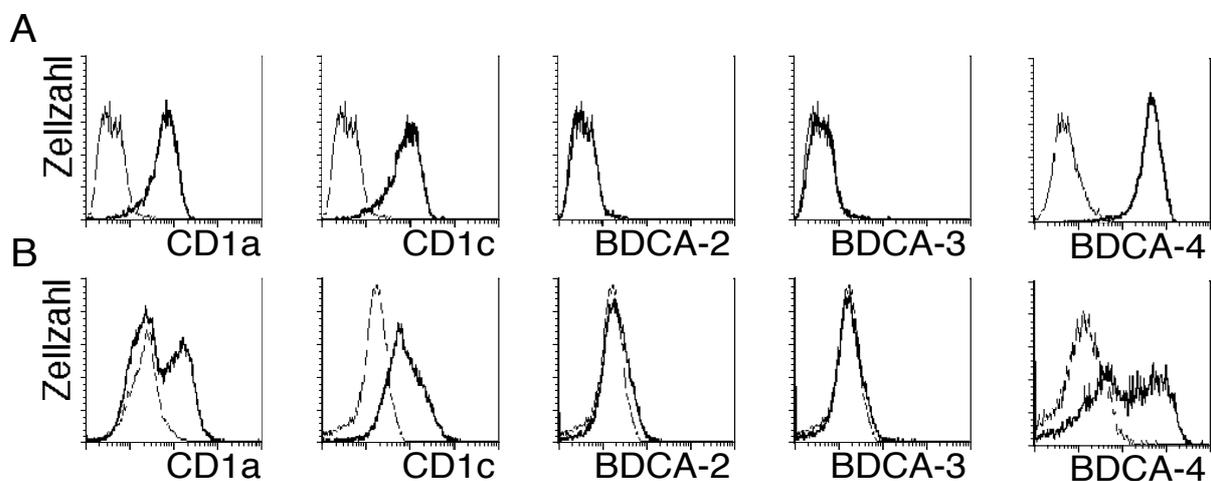


Abbildung 3.10: Ausprägungsniveau von BDCA-2, BDCA-3, BDCA-4 und CD1c auf imMo-DC und DC, die aus CD34⁺ Vorläuferzellen generiert wurden. DC wurden aus CD14⁺ Monozyten nach 7 Tagen Kultivierung in Gegenwart von IL-4 und GM-CSF und aus CD34⁺ Vorläuferzellen nach 11 Tagen Kultivierung in Gegenwart von Flt3-Ligand, TGF- β 1, TNF- α , SCF und GM-CSF generiert. imMo-DC (A) und DC, die aus CD34⁺ Vorläuferzellen generiert wurden (B), wurden mit CD1a-FITC, CD1c-PE (AD5-8E7), anti-BDCA-2-PE (AC144), anti-BDCA-3-PE (AD5-5E8) und anti-BDCA-4-PE (AD5-17F6) gefärbt (dicke Linie). Die dünnen Linien zeigen die Färbung mit Kontrollantikörper gleichen Isotyps. (B) Mit Ausnahme des linken Histogramms (CD1a-Färbung) sind in den Histogrammen nur CD1a⁺ Zellen dargestellt.

3.2 Charakterisierung von CD1c⁺, BDCA-2⁺/BDCA-4⁺ und BDCA-3⁺ BDC

3.2.1 Morphologie und Phänotyp

CD1c⁺, BDCA-2⁺/BDCA-4⁺ und BDCA-3⁺ BDC wurden mit Hilfe magnetischer Zellsortierung aus PBMC von gesunden Spendern isoliert, auf Objektträger zentrifugiert und ihre Morphologie mittels May-Grünwald/Giemsa-Färbung untersucht. Zellen, die BDCA-2 und BDCA-4 ausprägen, zeigen eine typische lymphoplasmazytoide Morphologie. Diese ist charakteristisch für CD11c⁻ CD4⁺ lin⁻ PDC aus Blut und Tonsillen und zeichnet sich durch eine runde Form der Zellen und runden bzw. hantelförmigen Zellkern aus (O'Doherty et al., 1994; Grouard et al., 1997; Robinson et al., 1999). Im Gegensatz dazu zeigen aufgereinigte CD1c⁺ und BDCA-3⁺ BDC eine eher myeloide Morphologie, wie die von den CD11c⁺ CD4⁺ lin⁻ BDC. Sie sind weniger rund, haben kurze Zellfortsätze und gelappte Kerne (O'Doherty et al., 1994; Grouard et al., 1996). Auf dem Objektträger mit aufgereinigten CD1c⁺ PBMC sind außer CD1c⁺ BDC auch CD1c⁺ B-Zellen zu sehen. Diese Zellen weisen eine Morphologie auf, die typisch für kleine ruhende Lymphozyten ist, und sind daher von den BDC leicht zu unterscheiden (Abbildung 3.11).

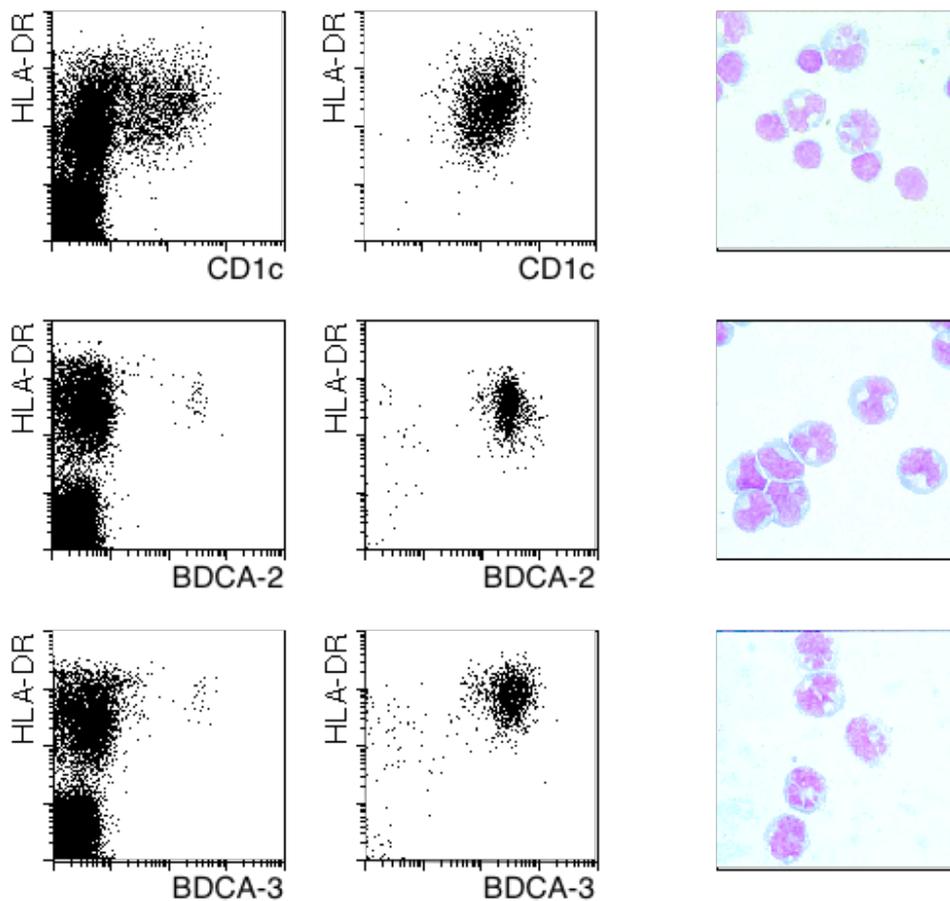


Abbildung 3.11: Morphologie von immunomagnetisch aufgereinigten CD1+, BDCA-2+ und BDCA-3+ BDC. CD1+, BDCA-2+ und BDCA-3+ Zellen wurden indirekt magnetisch markiert (PE-konjugierte mAk (AD5-8E7, AC144 und AD5-5E8)/anti-PE-AKB) und mit Hilfe von MACS isoliert. Die Punktdiagramme zeigen eine Färbung von PBMC mit anti-HLA-DR-FITC und PE-konjugierten mAk gegen CD1c, BDCA-2 und BDCA-3 vor (linke Spalte) und nach (mittlere Spalte) der Anreicherung von CD1c+, BDCA-2+ und BDCA-3+ Zellen. In der rechten Spalte ist die May-Grünwald/Giemsa-Färbung von aufgereinigten CD1c+ (oberes Bild), BDCA-2+ (mittleres Bild) und BDCA-3+ (unteres Bild) Zellen gezeigt. In dem oberen Bild sind neben den CD1c+ BDC auch CD1c+ B-Zellen sichtbar.

Der Phänotyp der einzelnen Populationen wurde mit Hilfe von zwei-Farben (BDCA2+/BDCA-4+ und BDCA-3+ BDC) bzw. drei-Farben-Färbung (CD1c+ BDC) untersucht. Dabei wurden gesamte PBMC jeweils für BDCA-2 bzw. BDCA-3 gefärbt, um die Zielzellen zu markieren, und das Ausprägungsniveau des

jeweiligen Ag mit einer zweiten Farbe bestimmt. Bei den CD1c⁺ BDC mussten die Zellen für CD1c und CD19 gefärbt werden, um CD1c⁺ B-Zellen von der Analyse ausschließen zu können. Das Ausprägungsniveau des jeweiligen Ag wurde mit einer dritten Farbe bestimmt. Die Ergebnisse der phänotypischen Analyse sind in der Tabelle 3.2 dargestellt und können wie folgt zusammengefasst werden: keines der folgenden Ag wird von den BDC ausgeprägt: CD1a, CD8, CD15, CD16, CD19, CD20, CD23, CD25, CD27, CD34, CD61, CD69, CD71, CD77, CD80, CD83, CD133, Glycophorin A, TCR $\alpha\beta$, IgD, IgM und das Ag CMRF-56. Im Gegensatz dazu prägen alle untersuchten Zellen CD43, CD44, CD54 und MHC-Klasse I Moleküle auf einem vergleichbaren Niveau aus. Die BDCA-2⁺ BDC unterscheiden sich von den beiden anderen Populationen, indem sie den myeloiden Marker CD13, die Aktivierungsmarker CD40 und CD45RO und den lymphoiden Marker CD56 nicht ausprägen. Weiterhin prägen diese Zellen im Gegensatz zu den CD11c⁺ BDC CD45RA und in geringen Mengen auch CD10 aus. Eine Reihe von Ag wird von allen drei Populationen ausgeprägt, jedoch sind hier beträchtliche Unterschiede in der Stärke der Ausprägung zu beobachten.

Tabelle 3.2: Oberflächenphänotyp von BDCA-2+, BDCA-3+ und CD1c+ BDC.

Antigen	Klon	BDCA-2+ BDC	BDCA-3+ BDC	BDCA-1+ BDC
CD1a	HI149	-	-	-
CD1c	M241	-	-	+
CD2	S5.2	- /Subpopulation +	-	+
CD4	M-T321	++	+	+
CD5	CLB-T1/1	-	-/+	-
CD7	T-3A1,7F3	-/ Subpopulation +	-	+
CD8	Leu2a	-	-	-
CD10	HI10a	-/+	-	-
CD11a	G43-25B	+	n.g.	+
CD11b	M1/70.15.11.5	-	-	-/+
CD11c	Ki-M1	-	+	++
CD13	Leu117	-	+	+
CD14	TÜK4	-	-	-/+
CD15	VIMc6	-	-	-
CD16	CLB-FcR Gran/1	-	-	-
CD18	7E4	+	++	++
CD19	SJ25-C1	-	-	-
CD20	HI47	-	-	-
CD23	9P25	-	-	-
CD25	M-A251	-	-	-
CD27	M-T271	-	-	-
CD32	FLI8.26 (2003)	-	-	+
CD33	P67.6	-/+	+	++
CD34	HPCA-2	-	-	-
CD36	AC106	+	-/+	+
CD38	HIT2	+	++	++
CD40	FC3	-	-/+	-/+
CD43	1G10	+	+	+
CD44	IM7	+	+	+
CD45RA	F8-11-13	+	-	-
CD45RO	UCHL-1	-	+	+
CD54	HA58	+	+	+
CD56	NCAM16.2	-	-/ Subpopulation +	-/ Subpopulation +
CD58	AICD58	+	++	++
CD61	V/PL2	-	-	-
CD62L	Dreg56	++	+	+
CD64	10.1	-	-	+
CD69	FN50	-	-	-
CD71	LO1.1	-	-	-
CD77	38.13	-	-	-
CD80	DAL-1	-	-	-
CD83	HB15A	-	-	-
CD86	HA5.2B7	+	++	+++
CD98	HIM6	++	+++	+++
CD116	SC06	+	++	++
CD123	AC145	++	-	+
HLA-DR	AC122	+	+	++
HLA-DQ	TÜ169	+	+	++
HLA-A,B,C	W6/32	+	+	+
GPA	AC107	-	-	-
TCR $\alpha\beta$	T10B9.1A-31	-	-	-
AC133	AC133	-	-	-
Fc ϵ R I	15-1	-	-	+
IgD	TA4.1	-	-	-
IgG	polyklonal	-	-	+
IgM	SA-DA4	-	-	-
kappa	polyklonal	-	-	+
lambda	polyklonal	-	-	+
CLA	HECA-452	++	+++	+++
CMRF44	CMRF44	-	-	-/ Subpopulation +
CMRF56	CMRF56	-	-	-

n.g.: nicht getestet

Die BDCA-2+ Zellen zeigen ein niedrigeres Ausprägungsniveau bei CD18, CD38, CD58, CD98, CD116 und CLA, prägen aber dafür stärker CD4 aus. Erwähnenswert ist auch, dass einige Ag nur von einem Teil der jeweiligen

Population ausgeprägt werden. Bei den BDCA-2⁺ Zellen sind es CD2 und CD7, bei den CD1c⁺ Zellen CD11b, CD14, CD56 und CMRF-44 und bei den BDCA-3⁺ Zellen CD56. Die CD1c⁺ BDC unterscheiden sich von den beiden anderen Populationen durch die Ausprägung von CD2 und den Fc-Rezeptoren CD32, CD64 und FcεR1. Die Ausprägung der Fc-Rezeptoren CD32 und CD64 ist wahrscheinlich der Grund dafür, dass die Zellen positiv für IgG, κ und λ erscheinen. Zusätzlich prägen sie stärker die MHC-Klasse II Moleküle und schwächer den Liganden von CD62 aus. Interessant erscheint auch, dass das Ausprägungsniveau von CD2 und CD1c auf diesen Zellen umgekehrt proportional zu dem von CD14 ist (siehe auch Diskussion Kapitel 4.2). Die BDCA-3⁺ Zellen unterscheiden sich von den anderen beiden Populationen, indem sie weniger CD36 ausprägen und schwach positiv für CD5 sind. Ein sehr interessantes Ausprägungsmuster zeigt CD33, das auf BDCA-2⁺ Zellen nur schwach, auf den BDCA-3⁺ Zellen mittelstark und auf den CD1c⁺ Zellen stark ausgeprägt ist und sich dadurch neben CD11c und CD123 sehr gut zur Unterscheidung aller drei Populationen eignet.

3.2.2 Ausprägungsniveau von MHC-Klasse II, CD83 und kostimulatorischen Molekülen auf BDC nach Kultivierung

In diesem Experiment wurden frisch isolierte CD1c⁺ BDCA-3⁺ und BDCA-2⁺ BDC zwei Tage lang in Gegenwart von IL-3 kultiviert. Anschließend wurde das Ausprägungsniveau von CD1a, CD80, CD83, CD86 und HLA-DR bestimmt. Zum Vergleich wurden auch imMo-DC und mMo-DC untersucht (Sallusto et al., 1995; Sallusto et al., 1998).

Anders als die unreifen und reifen Mo-DC prägen BDC nach der Kultur kein CD1a aus (Abbildung 3.12). Im Gegensatz dazu sind die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, der Aktivierungsmarker CD83 und HLA-DR-Moleküle auf BDC nach Kultivierung deutlich hochreguliert. Das Ausprägungsniveau ist dabei vergleichbar mit dem auf mMo-DC. Das gleiche Experiment wurde zum Vergleich auch unter anderen Kulturbedingungen durchgeführt. Dabei wurden

die CD1c⁺, BDCA-2⁺ und BDCA-3⁺ BDC zwei Tage lang mit IL-3, GM-CSF und IL-4 kultiviert. Die dabei erhaltenen Ergebnisse waren mit den oben beschriebenen nahezu identisch (Ergebnisse nicht gezeigt).

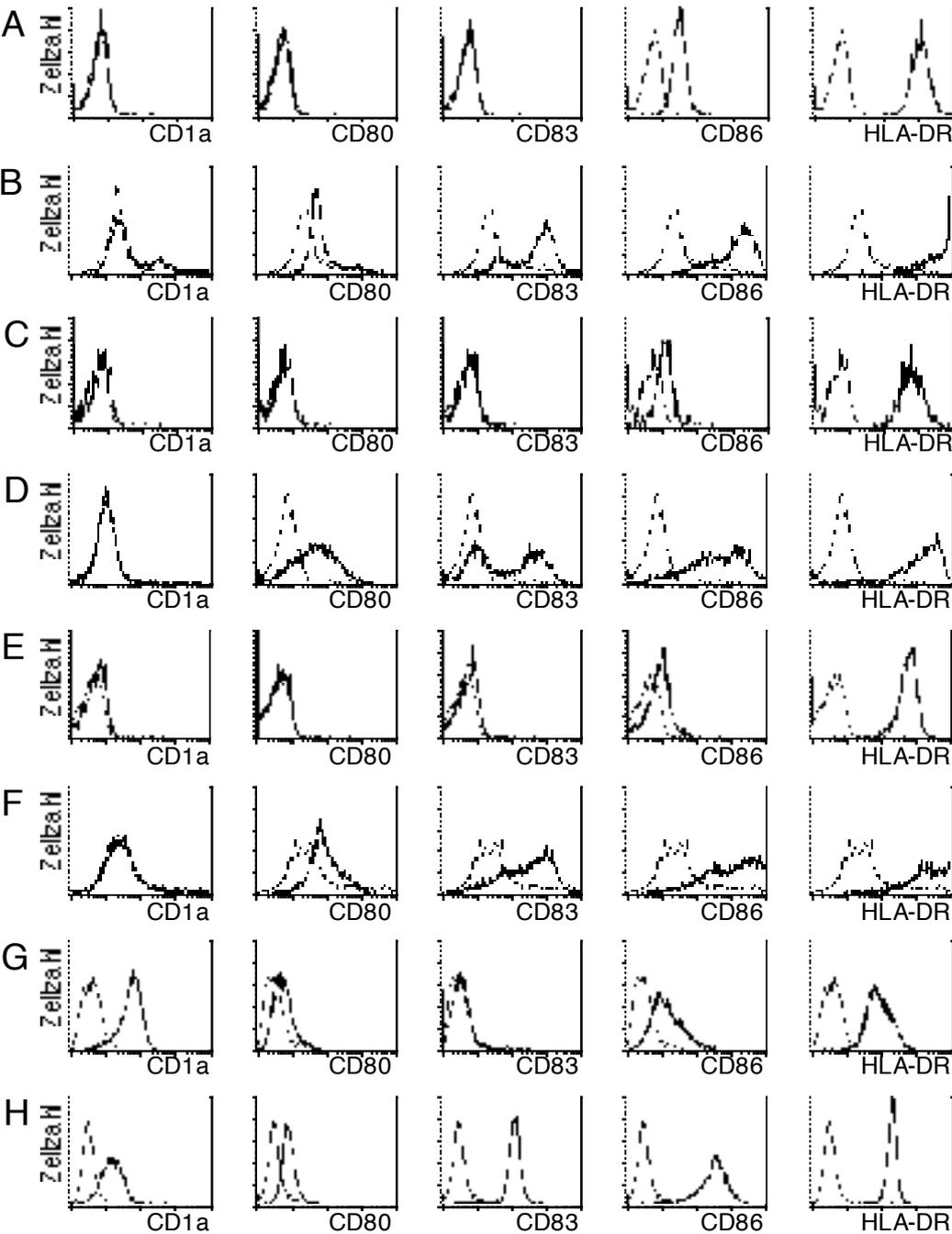


Abbildung 3.12: Ausprägungsniveau von HLA-DR, CD83, CD1a und den kostimulatorischen Molekülen CD80 und CD86 auf CD1c⁺ BDC, BDCA-2⁺ BDC, BDCA-3⁺ BDC, imMo-DC und mMo-DC nach Kultivierung mit IL-3. Aufgereinigte CD1c⁺ BDC (A), BDCA-3⁺ BDC (C) und BDCA-2⁺ BDC (E) wurden 2 Tage in Medium mit IL-3 kultiviert (kultivierte CD1c⁺ BDC (B), BDCA-3⁺ BDC (D) und BDCA-2⁺ BDC (F)). imMo-DC (G) und mMo-DC (H) wurden aus CD14⁺ Monozyten entsprechend des Protokolls (siehe Materialien und Methoden) generiert. Die Histogramme zeigen die Färbung mit CD1a-FITC, CD80-PE, CD83-PE, CD86-PE und anti-HLA-DR-PE (dicke Linie). Die dünnen Linien zeigen Färbung mit irrelevantem mAk des jeweils gleichen Isotyps.

3.2.3 Antigenaufnahme Kapazität

Aufgereinigte CD1c⁺, BDCA-2⁺ und BDCA-3⁺ BDC wurden bei 37°C mit LY kultiviert und die Aufnahme von LY in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer durchflusszytometrisch bestimmt. Als Kontrollen wurden gleichzeitig CD3⁺ T-Zellen und imMo-DC untersucht. Die BDC können nur bedingt besser lösliches Ag aufnehmen als aufgereinigte CD3⁺ T-Zellen. Die imMo-DC dagegen zeigen eine deutlich höhere endozytotische Kapazität im Vergleich zu den CD1c⁺, BDCA-2⁺ und BDCA-3⁺ BDC (Abbildung 3.13).

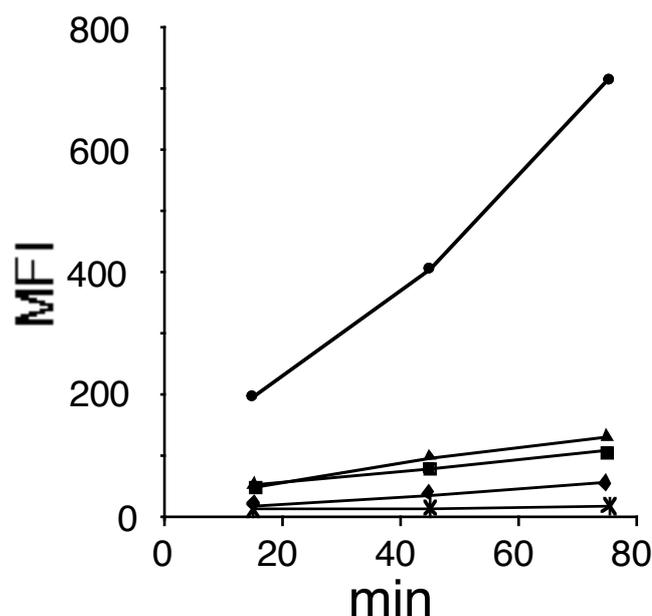


Abbildung 3.13: Endozytotische Kapazität von frisch aufgereinigten BDCA-2⁺, BDCA-3⁺ und CD1c⁺ BDC im Vergleich zu CD3⁺ T Zellen und imMo-DC. CD1c⁺ BDC (▲), BDCA-2⁺ BDC (◆), BDCA-3⁺ BDC (■), CD3⁺ T-Zellen (*) und imMo-DC (●) wurden bei 37°C in Gegenwart von LY (1 mg/ml) kultiviert, dreimal mit kaltem PBS/EDTA/BSA gewaschen und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind MFI-Werte von LY.

3.2.4 Stimulatorische Kapazität

Die stimulatorische Kapazität von frisch isolierten CD1c⁺, BDCA-2⁺ und BDCA-3⁺ BDC wurde in einem T-Zell-Proliferationsexperiment untersucht. Zu diesem Zweck wurden aufgereinigte BDC zusammen mit CD3⁺ T-Zellen in unterschiedlichen Verhältnissen kultiviert und anschließend die Proliferation von T-Zellen bestimmt. Wie man der Abbildung 3.14 entnehmen kann, waren die BDCA-2⁺ BDC nur schwache Stimulatoren von naiven T-Zellen. Sie stimulierten die T-Zellen sogar bei einem Verhältnis von 1:12,5 (DC:T-Zellen) nur geringfügig besser als aufgereinigte CD14⁺ Monozyten. Im Vergleich dazu stimulierten CD1c⁺ BDC naive T-Zellen viel effizienter. Dabei waren die CD1c⁺ BDC die mit Abstand besten Stimulatoren und induzierten eine effiziente T-Zell-Proliferation schon bei einem Verhältnis von 1:200 (DC:T-Zellen; Abbildung 3.14).

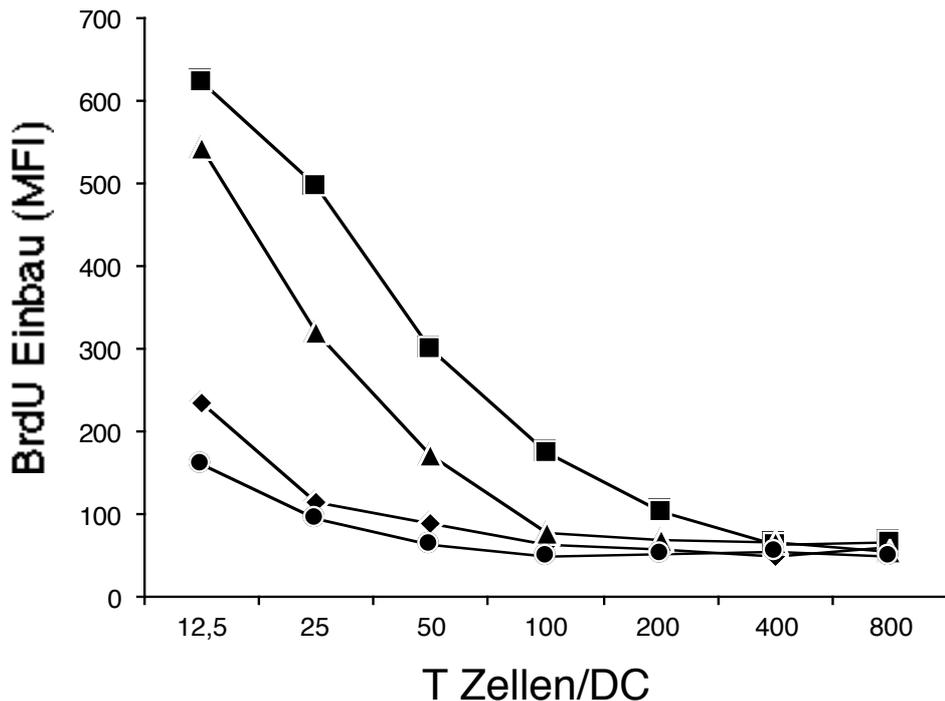


Abbildung 3.14: Stimulatorische Kapazität von BDCA-2⁺, BDCA-3⁺ und CD1c⁺ BDC im Vergleich zu CD14⁺ Monozyten. Aufgereinigte BDCA-2⁺ BDC (◆), BDCA-3⁺ BDC (▲), CD1c⁺ BDC (■) und CD14⁺ Monozyten (●) wurden zusammen mit aufgereinigten CD45RA⁺ CD3⁺ naiven T-Zellen 5 Tage kultiviert. Während der letzten 16 h wurde zu den Zellen 5-bromo-2-desoxyuridin (BrdU) zugegeben. Die Proliferation der Zellen wurde anhand des BrdU-Einbaus bestimmt. Die CD11c⁺ BDC (BDCA-3⁺ und CD1c⁺) stimulieren naive T-Zellen viel effizienter als BDCA-2⁺ BDC und CD14⁺ Monozyten. Die BDCA-2⁺ PDC induzieren nur unwesentlich besser die T-Zell-Proliferation als die CD14⁺ Monozyten.

3.3 Biochemische Charakterisierung von BDCA-2, BDCA-3 und BDCA-4 und Klonierung der kodierenden Gene

3.3.1 Immunopräzipitation

Immunopräzipitation von BDCA-2 aus ¹²⁵I-markierten, frisch isolierten PDC und BDCA-2 transfizierten U937-Zellen ergab eine dominante Bande bei ~38 kD. Zusätzlich zu dieser Bande war in allen Präparationen eine Bande von ~85 kD Größe und bei den frisch isolierten PDCs eine weitere ~45 kD große Bande zu

sehen. Die Kontrolle mit einem irrelevanten Maus-IgG1 mAk ergab keine Bande (Abbildung 3.15).

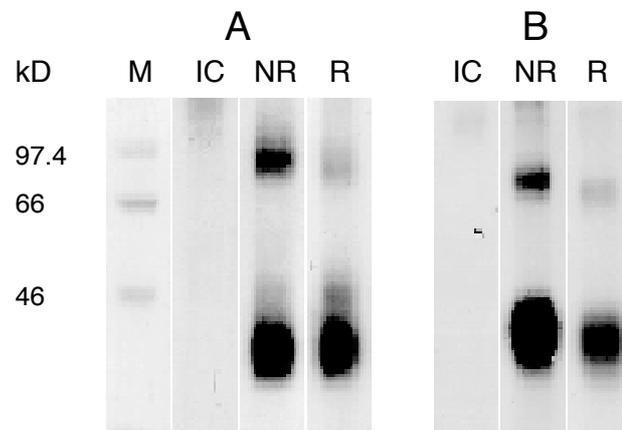


Abbildung 3.15: SDS-PAGE-Analyse von immunopräzipitiertem BDCA-2 aus ^{125}I -markierten PDC (A) und BDCA-2 transfizierten U937-Zellen (B). BDCA-2 erschien sowohl unter reduzierenden (R) als auch unter nicht reduzierenden (NR) Bedingungen als eine ~38 kD Bande. Außerdem war eine Bande von ~85 kD in allen Präparationen zu sehen. Immunopräzipitate aus PDC ergaben zusätzlich eine Bande von ~45 kD Größe. Kontrollpräparationen mit einem irrelevanten mAk gleichen Isotypen (IC) ergaben keine Banden.

3.3.2 Identifizierung von BDCA-3 und BDCA-4 anhand tryptischer Spaltung

(durchgeführt von Gregor Winkels (Miltenyi Biotec), Yoshiaki Sohma und Jun Nagafune (Pharmaceutical Research Laboratory, Kirin Brewery Company, Limited, Gunma, Japan))

Immunopräzipitationen von BDCA-3 und BDCA-4 ergaben spezifische Banden von jeweils ~100 kD und 130-140 kD Größe (Ergebnisse nicht gezeigt). Für die weiteren Untersuchung wurden diese Banden aus dem Gel herausgeschnitten und die aufgereinigten Proteine mit Hilfe von Trypsin gespalten. Die Bestimmung der Zusammensetzung entstandener Oligopeptide erfolgte mittels MALDI (matrix-assisted UV laser desorption/ionization) -TOF (time of flight) Massen-Spektrometrie. Es stellte sich dabei heraus, dass BDCA-3 identisch mit dem Molekül Thrombomodulin (CD141) und BDCA-4 mit

dem Molekül Neuropilin-1 ist. Diese Ergebnisse wurden anschließend mit Hilfe von transfizierten Zelllinien und mittels Immunopräzipitation bestätigt (Ergebnisse nicht gezeigt).

3.3.3 Identifizierung von BDCA-2 mittels Ausprägungsklonierung

(durchgeführt von Yoshiaki Sohma und Jun Nagafune (Kirin))

Für die Identifizierung von BDCA-2 wurde eine Ausprägungsbibliothek aus aufgereinigten PDC im pEF18SR Plasmid, einem Abkömmling des Ausprägungsvectors pEF18S (Ohashi et al., 1994), hergestellt. Mit dieser Bibliothek wurden COS1-Zellen transient transfiziert und BDCA-2⁺ Klone mit Hilfe von AC144 mAb markiert und isoliert. Die Analyse der Plasmid-DNA aus diesen Klonen ergab eine cDNA-Sequenz von 1313 Basenpaaren (bp) Länge, wovon sich 491 bp in der 5' nicht translatierten Region (UTR), 642 bp im offenen Leseraster, 150 bp in der 3' UTR und 30 bp in der poly(A)-Region befanden (GenBank/EMBL/DDBJ Nummer AF293615). Das offene Leseraster kodiert ein neues, 213 Aminosäuren (AS) großes Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 25,021 kDa. Das Vorhandensein einer einzelnen hydrophoben Region innerhalb der AS-Sequenz (AS 22-41) deutet darauf hin, dass BDCA-2 nur eine transmembrane Domäne besitzt und damit zu den Typ II transmembranen Proteinen gehört. Die weitere Analyse der AS-Sequenz ergab, dass BDCA-2 eine einzelne Kohlenhydraterkennungsdomäne (CRD) besitzt. Diese enthält das Glutamat-Prolin-Asparagin- (EPN, Position 172-174) Motiv und zwei Ca²⁺-Bindungsstellen (Abbildung 3.16). Demzufolge handelt es sich bei BDCA-2 um ein Ca²⁺ abhängiges (C-Typ) Lektin mit einer potentiellen Mannose-Spezifität. Weiterhin befinden sich innerhalb der extrazellulären Domäne von BDCA-2 drei N-Glykosylierungsstellen (AS 110-113, 137-140 und 164-167) und innerhalb der 21 AS kurzen intrazellulären Domäne ein tri-Glutamat-Motiv (EEE), das für den Transport durch die Endosom-Lysosomale Route zu den MHC-Klasse II Kompartimenten nach der

Internalisation verantwortlich ist (Mahnke et al., 2000; Engering et al., 2002; Abbildung 3.16).

Der Vergleich der AS-Sequenzen in der GenBank und EMBL ergab hohe Homologiegrade zwischen BDCA-2 und einigen anderen Typ II C-Typ-Lektinen. Den höchsten Homologiegrad erreicht dabei das Maus-Dectin-2 (50,7% AS Übereinstimmung; Ariizumi et al., 2000) und humanes DCIR (42,1% AS Übereinstimmung; Bates et al., 1999; Abbildung 3.16). Anhand der absoluten Übereinstimmung zwischen der Sequenz der BDCA-2 kodierenden cDNA und den Sequenzen von sieben genomischen DNA-Fragmenten in der GenBank EMBL und DDBJ (Nr. AC006517: Klon RP11-277J24) konnte das humane BDCA-2-Gen dem kurzen Arm des Chromosoms 12 zugeordnet werden.

```

BDCA-2      MVPEEEPQDR--EKGLWWFQLKVMSMAV-----VSILLLSVCFTVS 39
DECTIN-2    MVQERQSQG---KGVCWT-LRLWSAAV-----ISMLLLSTCFIAS 36
DCIR        MTSEITYAEVRFKNEFKSSGINTASSAASKERTAPHKSNTGFPKLLCASLLIFFLLLAIS 60
           * . *           : .           : . * * .           * : : :           : *

                                           C   W       C H
BDCA-2      SVVPHNFMYSKTVKRLSKLREYQQYHPSLTCVMEGKDIED--WSCCPTPWTSFQSSCYFI 97
DECTIN-2    CVVTYQFIMDQPSRRLYEL--HTYHSSLTCFSEGTMVSEKMWGCCPNHWKSFGSSCYLI 93
DCIR        FFIAFVIFFQKYSQLLEKKTTKELVHTTLECVKKNMPVEETAWSCCPKNWKSFSSNCYFI 120
           . : . . : . : : * :           . * : * * . : . : . : * : * * . * : * * : *

           Δ   A   C           A A   E HA           ΔAGA +           Δ H
BDCA-2      STGMQSWTKSQKNCSVMGADLVVINTREEQDFIIQNLKRNSSYFLGLSDPGGRHWQWVD 157
DECTIN-2    STKENFWSTSEQNCVQMGAHLVVINTEAEQMFITQQLNESLSYFLGLSDPQGMGKWQWID 153
DCIR        STESASWQDSEKDCARMEAHLVINTQEEQDFIFQNLQEESAYFVGLSDPEGQRHWQWVD 180
           **          * * : : * * * : * * * * . ** : ** * : * : . : * : * * * * * * . : * * : *

           H           W   +P++  ++CA           W++  C           C
BDCA-2      QTPYNENVTFWHSGEPNNLDERCAIINFR-SSEEWGWNDIHCHVPQKSICKMKKIYI 213
DECTIN-2    DTPFSQNVRFWHPHEPNLPEERCVSIVYW-NPSKWGWNDFCDSKHNSICEMKKIYL 209
DCIR        QTPYNESSTFWHPREPSDPNERCVVLLNFRKSPKRWGWNDNCLGPQRSVCEMMKIHL 237
           : * : : . . * * . * * . : * * . : : . . . * * * * : * : : * : * * **

```

* identische bzw. konservierte AS
: konservierter AS Austausch
. semi-konservierter AS Austausch
in rot Transmembrane Region
in blau Kohlenhydrat Erkennungsdomäne (CRD)

Folgende Symbole kennzeichnen AS, die zwischen den einzelnen C-Typ Lektinen innerhalb der CRD hochkonserviert sind:

H hydrophobe AS
A aliphatische AS
C Cystein
G Glycin
E Glutamat
W Tryptophan
Δ aromatische AS
+ AS die in die Bindung von Kohlenhydraten involviert sind
+P++ diese Sequenz bestimmt die Kohlenhydrat-Spezifität

Abbildung 3.16: AS-Sequenz-Vergleich zwischen den Typ II C-Typ-Lektinen BDCA-2, Maus Dectin-2 und humanem DCIR.

Die weitere Analyse der genomischen BDCA-2-Sequenz im Hinblick auf das Vorhandensein von konservierten Spleiß-Donor- (5'(C/A)AG-GU(A/G)AGU) und -Akzeptor-Stellen (5'U/C)11N(U/C)AG-(G/A)) (Padgett et al., 1986), als auch das Klonieren mehrerer Spleißvarianten von BDCA-2 (s. Kapitel 3.4.2) ermöglichten eine genaue Bestimmung der Intron-Exon-Schnittstellen. Diese Schnittstellen ergeben eine Zahl von sieben Exons, die jeweils für folgende Domänen kodieren: Exon 1 (bp 1-361) 5' UTR, Exon 2 (bp 362-522) 5' UTR und die ersten 10 AS der intrazellulären Domäne, Exon 3 (bp 523-615) 11 AS der intrazellulären Domäne und 20 AS der transmembranen Domäne, Exon 4 (bp 616-726) 37 AS zwischen der transmembranen Domäne und der CRD, Exon 5 (bp 727-872) 4 AS vor der CRD und 45 AS in der CRD, Exon 6 (bp 873-988) 39 AS in der CRD, Exon 7 (bp 989-1283) 47 AS in der CRD und die 3' UTR. Die genomische Komposition (Exon-Intron-Verteilung) von BDCA-2 ist nahezu identisch zu der des Maus Dectin-2.

3.4 Molekulare und funktionelle Charakterisierung von BDCA-2

3.4.1 Ausprägung der BDCA-2-mRNA in Geweben und Zellen aus dem Blut

Die Ausprägung von BDCA-2 in verschiedenen Geweben und Leukozyten-Populationen wurde mittels PCR bestimmt. Zu diesem Zweck wurden T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten, CD11c⁺⁺ CD123^{+/-} BDC und CD11c⁻ CD123⁺⁺ PDC magnetisch isoliert und die mRNA aufgereinigt. Für die Gewebeproben wurde Erst-Strang-cDNA (CLONTECH Laboratories) verwendet. Wie man der Abbildung 3.17 entnehmen kann, konnte das BDCA-2-Transkript voller Länge mit 34 PCR-Zyklen in aufgereinigten CD11c⁻ CD123⁺⁺ PDC nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde bei allen getesteten Geweben und auch bei

den restlichen Leukozytenpopulationen (außer Monozyten; Abbildung 3.17 B) kein PCR-Produkt erhalten. In PDC konnten zusätzlich weitere, kürzere Fragmente (Spleißvarianten) nachgewiesen werden.

Da PDC bereits in mehreren Geweben (unter anderem in Tonsillen) gefunden wurden (Facchetti et al., 1988; Cella et al., 1999; Jahnsen et al., 2000), war es verwunderlich, dass hier keine BDCA-2 mRNA nachgewiesen werden konnte. Zwei mögliche Gründe dafür waren: (1) die PDC prägen außerhalb von Blut kein BDCA-2 aus, oder (2) die PCR-Analyse war nicht sensitiv genug, um die von ihnen transkribierte BDCA-2-mRNA nachzuweisen. Um die Sensitivität der PCR-Analyse zu erhöhen, wurde das gleiche Experiment mit vier zusätzlichen Zyklen (38 statt 34) durchgeführt.

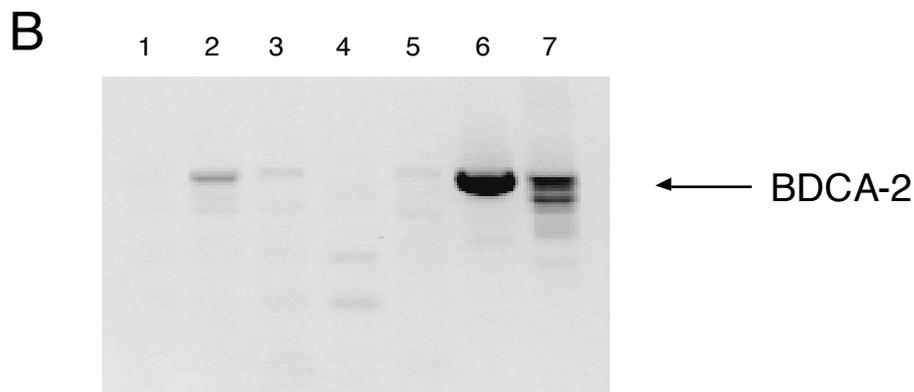
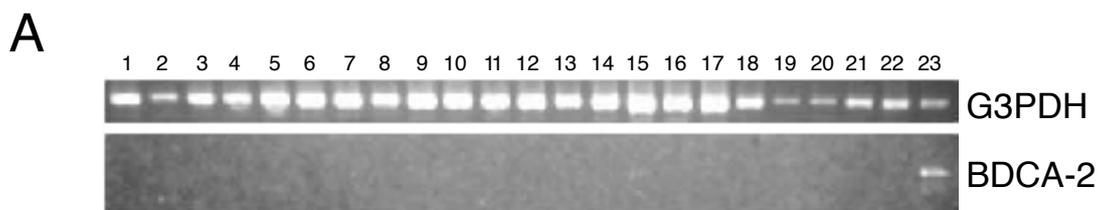


Abbildung 3.17: RT-PCR-Ausprägungsanalyse der mRNA von BDCA-2 in unterschiedlichen Geweben und Zellpopulationen. (A) 1, Herz; 2, Hirn; 3, Plazenta; 4, Lunge; 5, Leber; 6, Skelettmuskelgewebe; 7, Niere; 8, Pankreas; 9, Milz; 10, Thymus; 11, Hoden; 12, Eierstöcke; 13, Dünndarm; 14, LN; 15, Knochenmark; 16, fötale Leber; 17, Tonsille; 18, T-Zellen; 19, B-Zellen; 20, NK-Zellen; 21, Monozyten; 22, CD11c⁺ BDC; 23, CD123⁺ PDC (durchgeführt von Yoshiaki Sohma und Jun Nagafune (Kirin)). (B) 1, T-Zellen; 2, Monozyten; 3, imMo-DC; 4, mMo-DC; 5, Makrophagen; 6, BDCA-2 transfizierte U937-Zellen; 7, PDC.

In diesem Fall konnte die BDCA-2-mRNA auch in Tonsillen, Knochenmark, Pankreas, Hoden und Eierstöcken nachgewiesen werden, wobei die Signale nur sehr schwach waren (Ergebnisse nicht gezeigt). Um Zellen, die in diesen Geweben BDCA-2 ausprägten, genauer zu charakterisieren, wurden verschiedene Gewebeschnitte immunofluoreszent bzw. immunohistochemisch untersucht. Bei den Tonsillenschnitten wurde eine Reihe von Doppelfärbungen durchgeführt, bei denen jeweils anti-BDCA-2 (grün) gegen CD8, CD20, CD123 und HLA-DR (rot) gefärbt wurde (Abbildung 3.18). Die anschließende Analyse ergab, dass nur die HLA-DR⁺ CD123⁺ CD8⁻ CD20⁻ PDC BDCA-2 ausprägen.

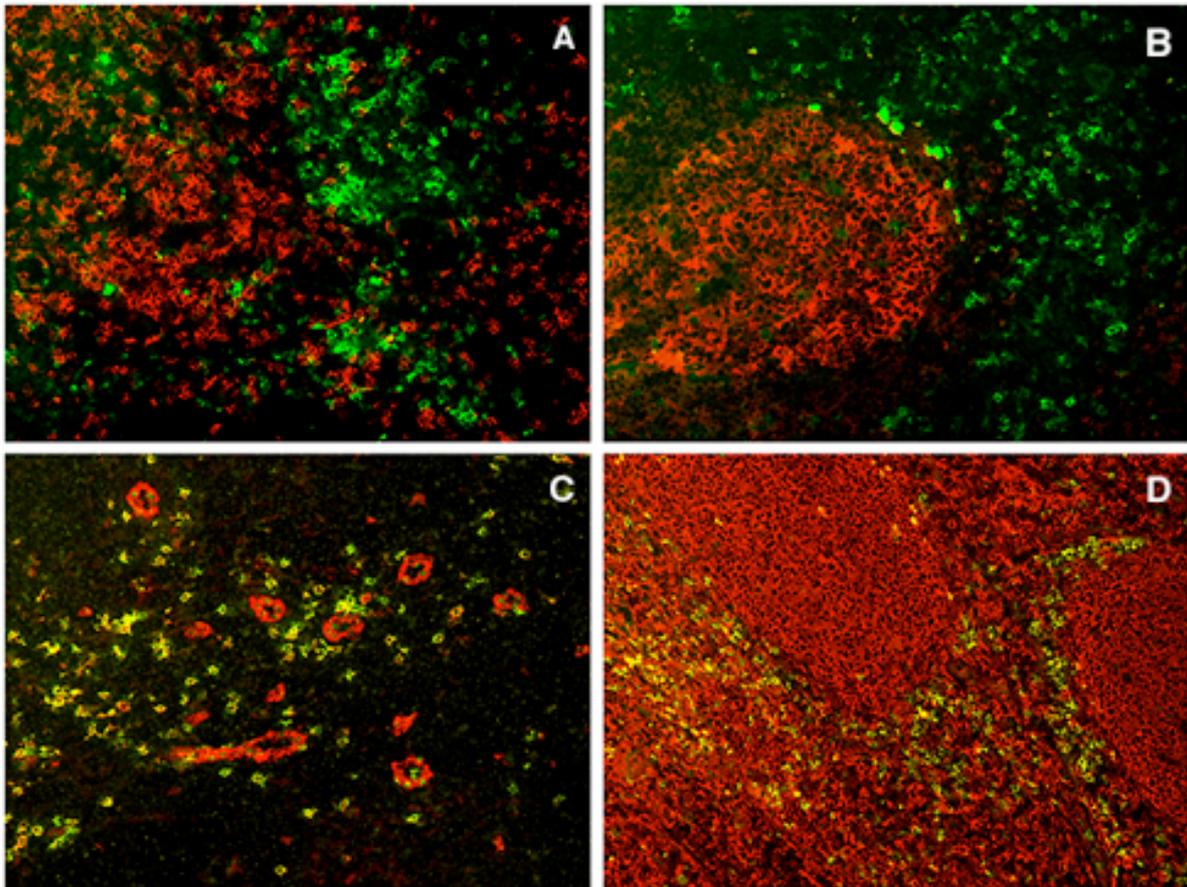


Abbildung 3.18: Anatomische Verteilung von BDCA-2⁺ PDC in entzündeten Tonsillen. Dargestellt sind Zweifarbenfärbungen von Gefrierschnitten von entzündeten Tonsillen, gefärbt mit anti-BDCA-2 (grün) und CD8 (A), CD20 (B), CD123 (C) und anti-HLA-DR (D; rot). BDCA-2⁺ PDC sind in den T-Zell-reichen extrafollikulären Regionen lokalisiert. Viele PDC sind in der Nähe von HEV zu finden (C), deren Zellen auch CD123, aber kein BDCA-2 ausprägen.

Diese Zellen sind entsprechend den früheren Beobachtungen (Grouard et al., 1997) in den T-Zell-reichen Zonen um die Keimzentren herum lokalisiert. Ein typisches Bild ergibt auch die Färbung mit anti-BDCA-2 und CD123, bei dem die BDCA-2⁺ CD123⁺⁺ PDC in der Nähe von Venolen mit hohem Endothel (HEV) anzutreffen sind. Die HEV prägen CD123 aus, sind aber ungleich den PDC negativ für BDCA-2 (Abbildung 3.18 C). Bei der immunohistochemischen Analyse von Gewebeschnitten aus Hoden von Seminoma-Patienten wurden BDCA-2⁺ CD123⁺ Zellen mit einer für die PDC charakteristischen Morphologie

nachgewiesen. Diese Zellen sind innerhalb der lymphoiden Aggregate lokalisiert, von denen der Tumor typischerweise infiltriert wird (Ergebnisse nicht gezeigt). Das normale Epithelium des Hodens ist dagegen negativ für BDCA-2. Für die Untersuchung von Knochenmark, Pankreas und Eierstöcken stand leider kein geeignetes Gewebe zur Verfügung.

3.4.2 Identifizierung der Spleißvarianten von BDCA-2

(durchgeführt von Gritt Günther (Miltenyi Biotec))

Die PCR-Amplifikation von BDCA-2 aus den PDC mit Hilfe von Primern, die innerhalb des Exon 2 (Vorwärts-Primer) und Exon 7 (Rückwärts-Primer) liegen, ergab eine Reihe von Banden, die sich alle im Bereich zwischen 757 bp (Produkt mit der vollen Länge) und ~500 bp befanden (Abbildung 3.19 A). Die Größe der einzelnen Banden korrelierte mit der errechneten Länge einiger BDCA-2 mRNA-Varianten, die theoretisch in Folge alternativen Spleißens entstehen könnten. Aufgrund der zu geringen Auflösung des verwendeten Agarose-Gels bestand zusätzlich die Gefahr, dass in der Bande von ~650 bp Größe zwei unterschiedliche BDCA-2 mRNA-Spleißvarianten enthalten sein könnten, nämlich die mit deletiertem Exon 3 bzw. ohne Exon 4 (665 bp bzw. 647 bp). Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden einzelne Banden aus dem Gel herausgeschnitten, rekloniert und anschließend sequenziert. Im Falle der oben genannten, potenziellen Doppelbande im Bereich von 650 bp wurde eine weitere PCR-Amplifikationsrunde mit zwei unterschiedlichen Primerpaaren durchgeführt. Mit dem ersten Primerpaar aus dem Exon 2 (Vorwärts-Primer) und Exon 4 (Rückwärts-Primer) wurde nur die Variante ohne Exon 3 amplifiziert, mit dem zweiten Primerpaar aus dem Exon 3 (Vorwärts-Primer) und Exon 7 (Rückwärts-Primer) dagegen nur die Variante ohne Exon 4. Insgesamt konnten neben der mRNA-Variante mit der vollen Länge fünf weitere Spleißvarianten identifiziert werden, denen jeweils folgende Exons fehlten: (a) Exon 3, (b) Exon 4, (c) Exon 5, (d) Exon 3 und 4, (e) Exon 3 und 5 (Abbildung 3.19 B). Die Translation dieser Spleißvarianten würde in BDCA-

2-Formen resultieren, denen folgende Domänen fehlen: (a) die transmembrane Domäne, (b) der Bereich zwischen der transmembranen Domäne und der CRD, (c) die ganze CRD (das Fehlen des fünften Exons resultiert in einer Verschiebung des Leserasters, was zur Entstehung eines Terminationskodons im Exon 6 führt), (d) ein Teil der intrazellulären Domäne, die ganze transmembrane Domäne und der Bereich zwischen der transmembranen Domäne und der CRD, (e) die transmembrane Domäne und die ganze CRD (Abbildung 3.19 B).

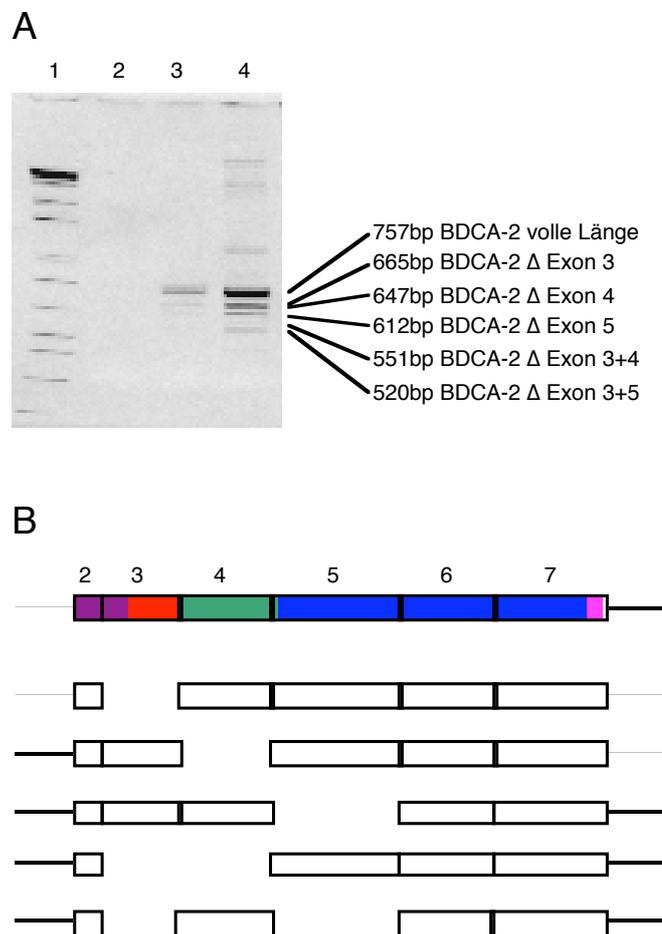


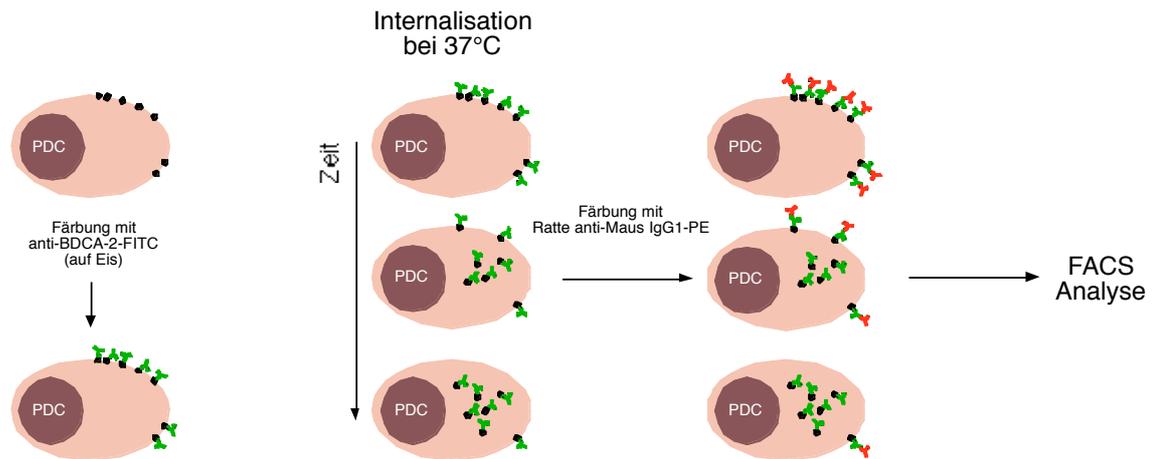
Abbildung 3.19: (A) Identifizierung alternativer Spleißvarianten von BDCA-2 mRNA. Aus aufgereinigten PDC wurde Poly(A)⁺ RNA isoliert und auf das Vorhandensein von BDCA-2-mRNA mit Hilfe von RT-PCR untersucht (Spur 2, 20 Zyklen; Spur 3, 25 Zyklen; Spur 4, 30 Zyklen). PCR-Produkte wurden mit Hilfe von TBE-PAGE größenfraktioniert. Eine weitere PCR-Amplifikation ermöglichte die Sequenzierung von einzelnen Spleißvarianten. (B) Schematische Darstellung der kodierenden Region von BDCA-2-mRNA. Die unterschiedlichen Farben

repräsentieren einzelne strukturelle Domänen (violett, zytoplasmatische Domäne; rot, transmembrane Domäne; grün, „neck“-Domäne; blau, CRD). Die kodierenden Exons (Exon 2-7) sind als Rechtecke dargestellt. Bei den einzelnen Spleißvarianten von BDCA-2 sind die fehlenden Exons als Lücken dargestellt.

3.4.3 BDCA-2-vermittelte Ag-Aufnahme und -Präsentation

Die spezifische Ausprägung von BDCA-2 auf unreifen PDC und die Runterregulation in Folge der Reifung sind typische Merkmale von Ag-Aufnahmerezeptoren und legten die Vermutung nahe, dass BDCA-2 in die Ag-Aufnahme und -Präsentation involviert sein könnte. Aus diesem Grund wurde die Internalisation von anti-BDCA-2 mAk (Klon AC144, IgG1) nach der Bindung an BDCA-2 untersucht. Dabei wurden aufgereinigte PDC bei 0°C mit FITC-konjugiertem AC144 mAk inkubiert und anschließend unterschiedlich lange bei 37°C kultiviert. Der Anteil am zelloberflächengebundenen anti-BDCA-2 mAk nach der Kultur wurde anhand der Färbung mit PE-konjugiertem RamG1 mAk bestimmt. Wie man der Abbildung 3.20 entnehmen kann, nimmt die MFI der PE-Färbung und damit die Menge des zelloberflächengebundenen AC144 mAk in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer rapide ab und erreicht bereits nach 10 min fast das Hintergrundniveau. Im Gegensatz dazu nimmt die Intensität der FITC-Färbung nur vorübergehend bis zu einem Niveau von ~50% der Ausgangsfluoreszenzintensität ab und erreicht später nahezu das Ausgangsniveau. Da AC144-FITC auch nach der Kultur bei 37°C an die Zellen gebunden ist (siehe FITC-Färbung), ist die Internalisation und nicht die Trennung der AC144-BDCA-2-Bindung für die rasche Abnahme der PE-Färbung verantwortlich. Die transiente Abnahme der FITC-Färbung ist wahrscheinlich auf die pH-Sensitivität von FITC zurückzuführen und wurde durch den niedrigen pH-Wert in den Lysosomen kurz nach der Internalisation verursacht.

A



B

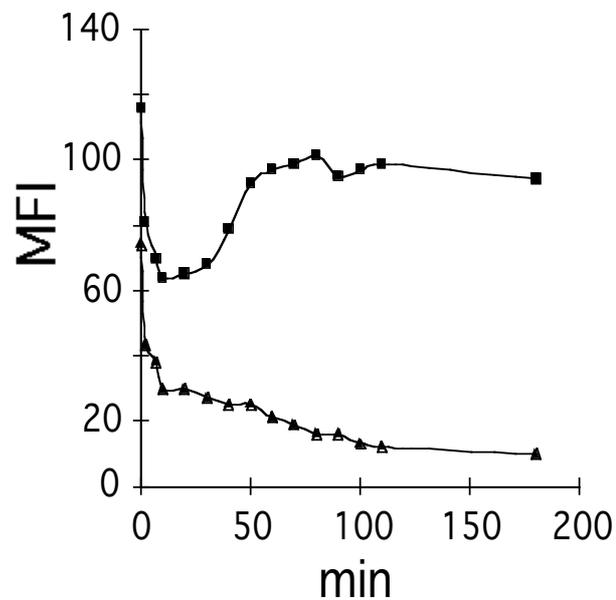


Abbildung 3.20: Kultivierung von PDC bei 37°C, die mit anti-BDCA-2 mAk markiert wurden, resultiert in einer schnellen Internalisation des mAk. (A) Versuchsaufbau: PBMC wurden bei 4°C mit FITC-konjugiertem anti-BDCA-2 (AC144, Maus IgG1) gefärbt und anschließend unterschiedlich lange bei 37°C kultiviert. Der Anteil an nicht internalisiertem, oberflächengebundenem primärem mAk (AC144) wurde anhand der Färbung mit PE-konjugiertem RamG1 mAk bestimmt. (B) Gezeigt sind MFI-Werte von anti-BDCA-2-FITC (■) und RamG1-PE (▲).

Bei den BDCA-2-transfizierten U937- und Jurkat-Zellen kann dagegen keine Internalisation festgestellt werden. Hier veränderte sich weder die Fluoreszenzintensität der FITC- noch der PE-Färbung in Abhängigkeit von der Kulturdauer (Ergebnisse nicht gezeigt). Dies liefert einen zusätzlichen Nachweis für die Stabilität der AC144-BDCA-2-Bindung bei 37°C.

Weiterhin wurde untersucht, ob der aufgenommene anti-BDCA-2 mAk via MHC Klasse II präsentiert werden kann. Zu diesem Zweck wurden aufgereinigte, bestrahlte PDC zusammen mit dem mAk AC144 und einem CD4⁺ T-Zell-Klon, der spezifisch für ein Maus IgG1 generiertes Peptid ist, kultiviert. Als Maß für die Effizienz der Ag-Präsentation wurde die Proliferationsrate der T-Zellen anhand des Einbaus von [³H]-markiertem Thymidin gemessen. Um eine Auskunft über den Hintergrund, der durch alternative (unspezifische) Ag-Aufnahmewege entstehen konnte zu erhalten, wurde als Negativkontrolle der Maus IgG1 mAk CK3-11D5 (anti-Zytokeratin) benutzt, der an keines der auf PDC ausgeprägten Oberflächenmoleküle bindet. Eine weitere Kontrolle stellt der Maus IgG1 mAk ZM3.8 dar, der den auf PDC ausgeprägten inhibitorischen Rezeptor ILT3 erkennt. ILT3 wurde unter anderen als ein Ag-Aufnahmerezeptor beschrieben, der seine Liganden nach der Bindung effizient aufnehmen und in die MHC II-Präsentationsroute einschleusen kann (Cella et al., 1997).

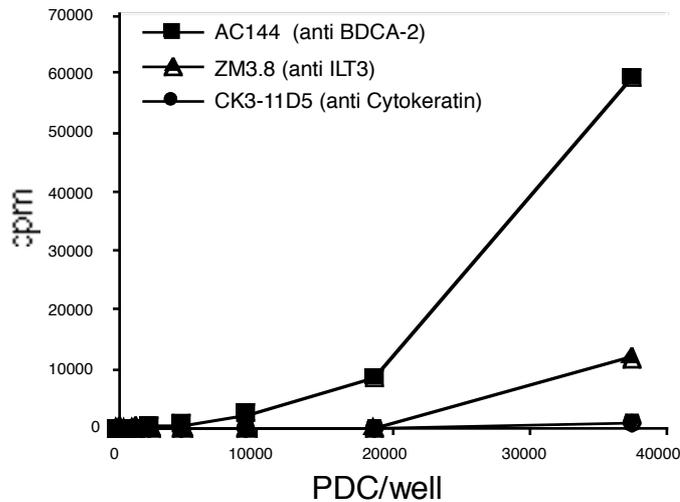


Abbildung 3.21: Bestrahlte PDC präsentieren effizient anti-BDCA-2 mAk (AC144, Maus IgG1), einem CD4⁺ T-Zell-Klon, der spezifisch für Maus IgG1 ist. Aufgereinigte bestrahlte PDC wurden in Gegenwart von mAk AC144, ZM3.8 und CK3-11D5 (200 ng/ml) und einem CD4⁺ T-Zell-Klon mit der Spezifität für Maus IgG1-generiertes Peptid kultiviert. Die Proliferation der T-Zellen wurde anhand des Einbaus vom radioaktivem Thymidin bestimmt. Anti-BDCA-2 mAk AC144 (■) wurde viel effizienter präsentiert als der anti-ILT3 mAk (▲) (ZM3.8). Der irrelevante anti-Zytokeratin mAk CK3-11D5 (●) induzierte keine T-Zell-Proliferation.

Wie man der Abbildung 3.21 entnehmen kann, wurde der mAk AC144 von den PDC wesentlich besser präsentiert als der anti-ILT3 mAk ZM3.8. Im Falle des anti-Zytokeratin mAk CK3-11D5 konnte keine Proliferation der T-Zellen gemessen werden.

3.4.4 Auswirkung der Bindung von AC144 mAk an BDCA-2 auf die [Ca²⁺]_i und die Tyrosin-Phosphorylierung intrazellulärer Proteine

Um herauszufinden, ob die Bindung von anti-BDCA-2 mAk an BDCA-2 eine Signaltransduktion zur Folge hat, wurde die Veränderung der [Ca²⁺]_i in PDC und BDCA-2 transfizierten U937- und Jurkat-Zellen nach der Zugabe von AC144 mAk gemessen. Wie in der Abbildung 3.22 B zu sehen ist, hat die

Bindung von AC144, gefolgt von kreuzvernetzendem RamG1 mAk, einen starken und vorübergehenden Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in PDC und BDCA-2 transfizierten U937-Zellen zu Folge. Im Gegensatz dazu kann kein Anstieg der intrazellulären $[Ca^{2+}]_i$ in BDCA-2 transfizierten Jurkat-Zellen (Ergebnisse nicht gezeigt) und in nicht transfizierten U937-Zellen gemessen werden. Die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ kann ebenfalls gemessen werden, wenn der kreuzvernetzende mAk nicht zugegeben wird (Ergebnisse nicht gezeigt), und wird durch die Zugabe an überschüssigem EGTA nicht beeinträchtigt (Abbildung 3.22 C). Der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ war nur schwach ausgeprägt, wenn die Zellen mit PP2, einem Inhibitor der Protein-Tyrosin-Kinasen der src-Familie, vorinkubiert wurden (Abbildung 3.22 D).

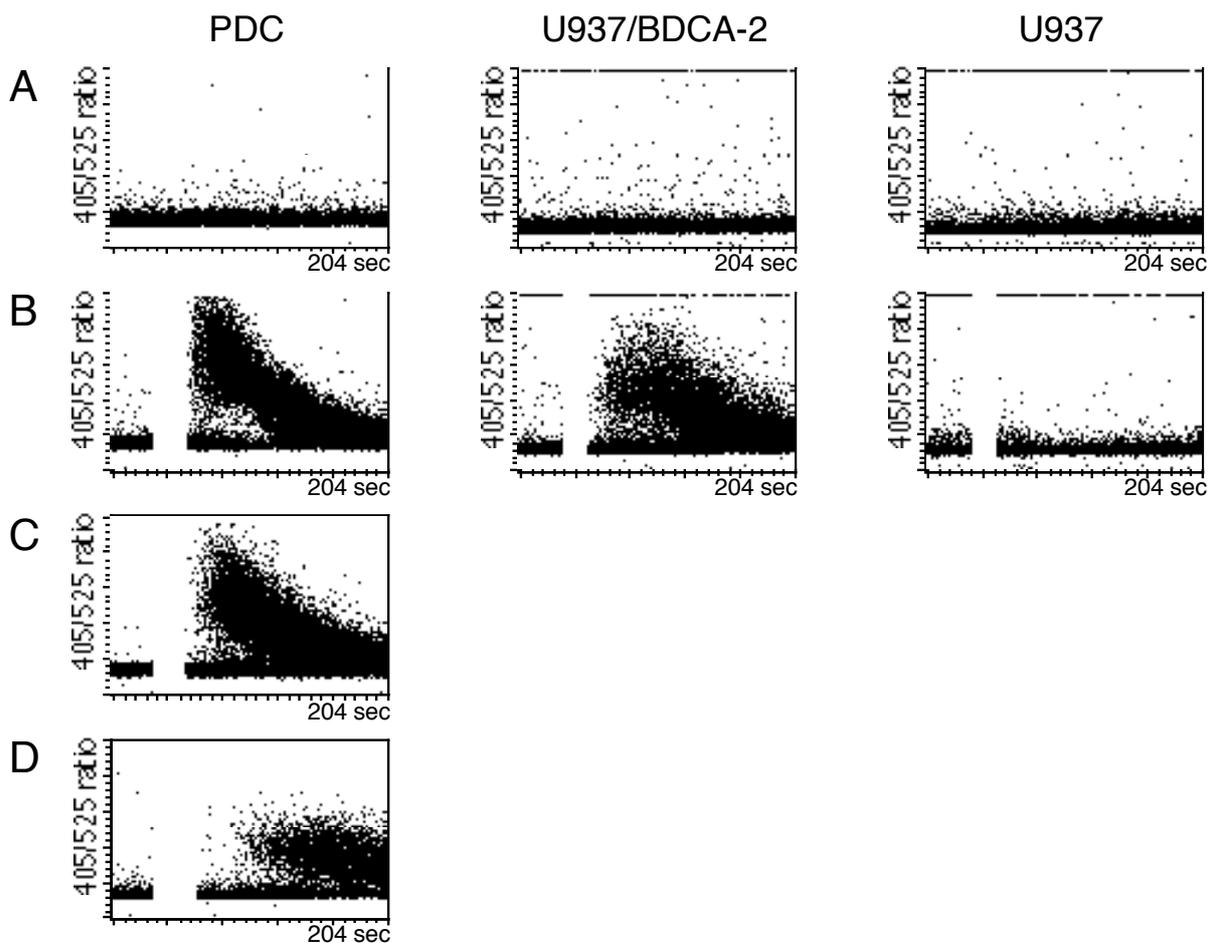


Abbildung 3.22: Bindung von mAk AC144 an BDCA-2 induziert einen schnellen und vorübergehenden Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in PDC und BDCA-2 transfizierten U937-Zellen. (A) Nicht stimulierte Proben (Hintergrundfluoreszenz). (B) Die Ligandierung von BDCA-2 mit dem mAk AC144 induziert einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in PDC (linkes Punktediagramm) und BDCA-2 transfizierten U937-Zellen (mittleres Punktediagramm), aber nicht in nicht transfizierten U937-Zellen (rechtes Punktediagramm). (C) Der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ wird durch die Zugabe von überschüssigem EGTA nicht beeinträchtigt. (D) Die Hemmung von Kinasen der src-Familie mit dem spezifischen Inhibitor PP2 inhibiert signifikant den Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$.

Aufgrund dieser Beobachtung wurde das Niveau der Protein-Tyrosin-Phosphorylierung vor und nach der Bindung von AC144 an BDCA-2 untersucht. Hierfür wurden Zellysate von PDC und BDCA-2 transfizierten U937- und Jurkat-Zellen vor und nach der Bindung von AC144 in einem anti-Phosphotyrosin-Western-Blot untersucht. Wie man der Abbildung 3.23 entnehmen kann, bewirkte die Bindung von AC144 mAk an BDCA-2 eine Erhöhung des Protein-Tyrosin-Phosphorylierungsniveaus in PDC und BDCA-2 transfizierten U937-Zellen. Bei den BDCA-2 transfizierten Jurkat-Zellen dagegen hatte die Inkubation mit anti-BDCA-2 mAk ähnlich wie schon bei der $[Ca^{2+}]_i$ keinen Effekt auf die Protein-Tyrosin-Phosphorylierung.

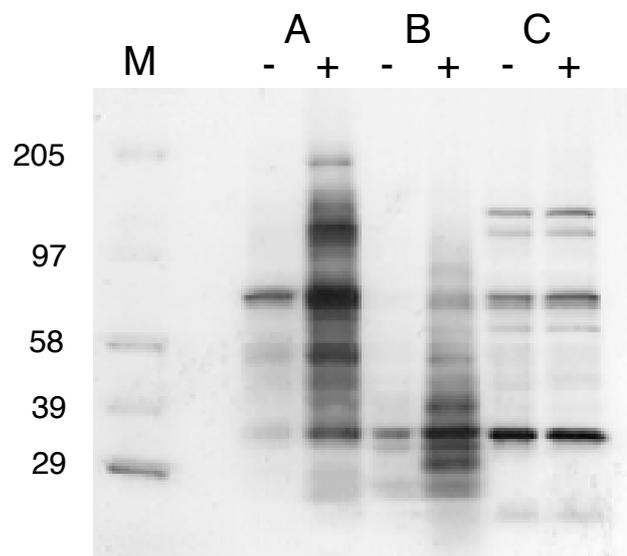


Abbildung 3.23: Bindung von mAk AC144 an BDCA-2 induziert Protein-Tyrosin-Phosphorylierung in PDC (A) und BDCA-2 transfizierten U937-Zellen (B), aber nicht in BDCA-2 transfizierten Jurkat-Zellen (C). Zellen wurden 2 min bei 37°C mit Medium (-) oder mit Medium in Gegenwart von anti-BDCA-2 mAk AC144 (+) inkubiert und anschließend lysiert. Zellysate wurden mit Hilfe von SDS-PAGE größenfraktioniert, auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und mit einem Meerrettichperoxidase-konjugiertem anti-Phosphotyrosin mAk PY20 entwickelt.

3.4.5 Einfluß der Bindung von AC144 mAk an BDCA-2 auf die Sekretion von Zytokinen bei PDC

Eine der bekanntesten Eigenschaften von PDC ist ihre Fähigkeit zur Sekretion großer Mengen von IFN α nach Stimulation mit (a) Viren (Gobl et al., 1988; Feldman et al., 1994; Cella et al., 1999; Kadowaki et al., 2000), (b) Bakterien (Svensson et al., 1996), (c) CpG-DNA (Kadowaki et al., 2001; Bauer et al., 2001), (d) dsRNA (poly(I:C)) (Bauer et al., 2001), (e) Seren von SLE-Patienten, die IFN α -induzierende Faktoren enthalten (höchstwahrscheinlich Komplexe aus autoreaktiven anti-DNA Ak und immunostimulatorischen, hypomethylierten DNA; Vallin et al., 1999), (f) Komplexen aus anti-ss/ds DNA mAk MER-3 und unmethylierten Plasmid-DNA (pcDNA3; Vallin et al., 1999).

Neben IFN α wird von PDC eine Reihe von weiteren Zytokinen als Antwort auf pathogene Stimuli produziert. Hier wurde der direkte Einfluß der Bindung von AC144 mAb an BDCA-2 auf die Sekretion von IFN α , TNF α , IL-8 und IL-12 nach Stimulation mit FLU, anti-ss/ds DNA mAk MER-3 plus Plasmid pcDNA3, Serum von Patienten mit SLE und CpG-DNA, untersucht. Die Koinkubation von PDC mit AC144 mAk in Gegenwart von zytokininduzierenden Stimuli hatte eine starke inhibitorische Wirkung auf die Sekretion von IFN α und TNF α im Vergleich zu zytokininduzierenden Stimuli allein (Abbildung 3.24).

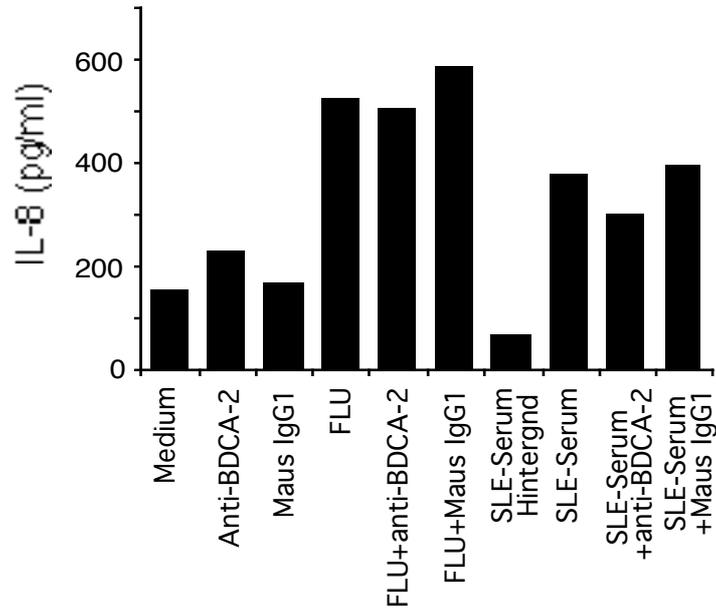
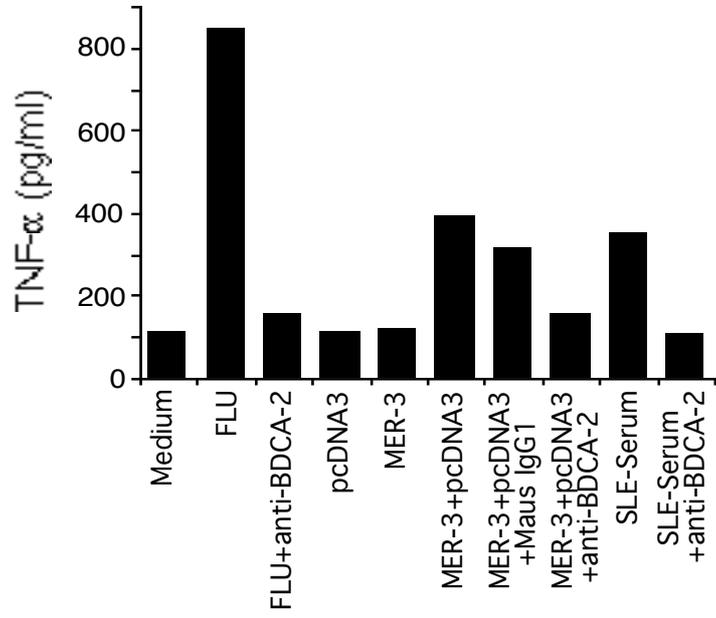
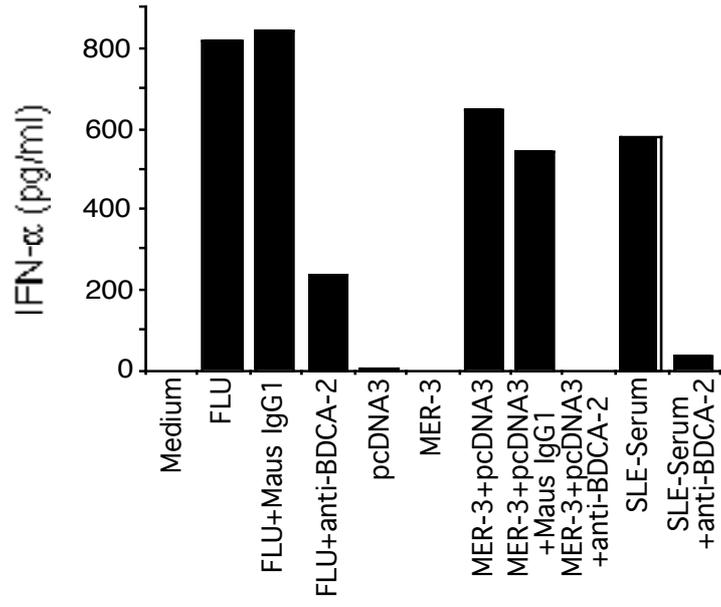


Abbildung 3.24: Bindung von mAk AC144 an BDCA-2 inhibiert die Sekretion von IFN α und TNF α , aber nicht von IL-8. Stimulation von PDC mit FLU, anti-ss/dsDNA mAk MER-3 plus Plasmid pcDNA3 oder Serum von Patienten mit SLE induziert Sekretion von großen Mengen an IFN α und TNF α . Die Sekretion beider Zytokine wird stark durch die Ligation von BDCA-2 mit AC144 inhibiert, aber nicht durch die Inkubation mit einem irrelevanten mAk gleichen Isotyps. Die Sekretion von IL-8 durch PDC in Antwort auf Stimulation mit FLU und Serum von Patienten mit SLE wird durch die Ligation von BDCA-2 nicht beeinflusst. Zytokinkonzentrationen in den Kulturüberständen nach 24 h wurden mittels ELISA bestimmt.

Die Koinkubation mit einem irrelevanten Maus IgG1 mAk, der nicht an PDC bindet, hatte dagegen keinen Effekt auf die Sekretion von IFN α und TNF α . Während bei den meisten zytokininduzierenden Stimuli (anti-ss/ds DNA mAk MER-3 plus Plasmid pcDNA3, Serum von Patienten mit SLE (Abbildung 3.24) und CpG-DNA (Ergebnisse nicht gezeigt)) eine nahezu 100%-ige Inhibition der IFN α -Produktion mit Hilfe von mAk AC144 erreicht wurde, konnte im Fall des Influenza-Virus nur eine partielle Inhibition (~75%) beobachtet werden.

Die TNF α -Sekretion wurde ebenso nur teilweise inhibiert. Die Titration von anti-BDCA-2 mAk zeigte zusätzlich, dass der inhibitorische Effekt von AC144 konzentrationsabhängig ist. Dabei waren Konzentrationen unter 100 ng/ml ausreichend, um eine 50%-ige Inhibition der IFN α -Antwort auf die Stimulation mit anti-ss/dsDNA mAk MER-3 plus Plasmid pcDNA3 zu erreichen (Abbildung 3.25). Im Gegensatz zu IFN α und TNF α wurde die Produktion von IL-8 weder durch die Koinkubation mit AC144 noch mit dem irrelevanten Maus IgG1 mAk signifikant beeinflusst (Abbildung 3.24). Mit Hilfe der oben genannten Stimulation war es nicht möglich, nachweisbare Mengen IL-12 p70 in PDC zu induzieren (Ergebnisse nicht gezeigt).

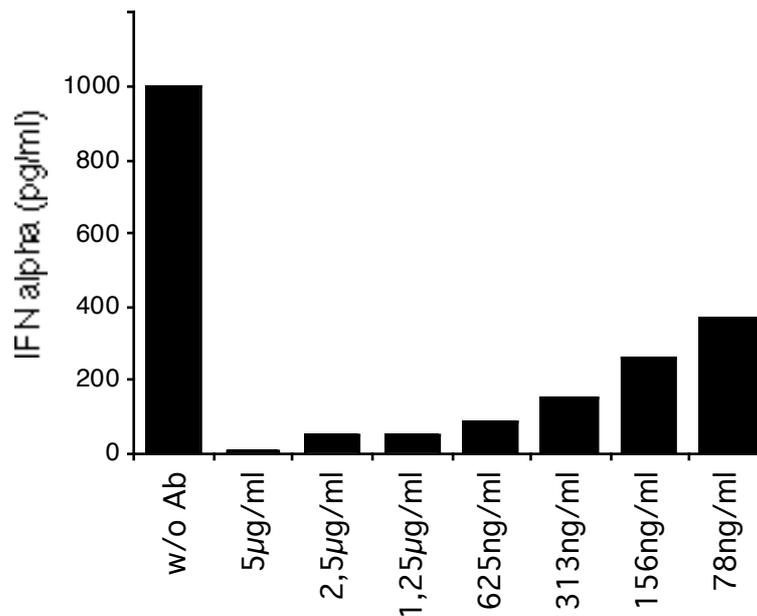


Abbildung 3.25: Der inhibierende Effekt von anti-BDCA-2 auf die IFN α -Sekretion ist konzentrationsabhängig. Aufgereinigte PDC wurden in Gegenwart von anti-ss/dsDNA mAk MER-3 plus Plasmid pcDNA3 und unterschiedlichen Konzentrationen von anti-BDCA-2 mAk AC144 kultiviert. Konzentrationen von IFN α in den Kulturüberständen nach 24 h wurden mittels ELISA bestimmt.

Die Sekretion von IFN α wurde zusätzlich durch andere Zytokine beeinflusst. Wie man der Abbildung 3.26 entnehmen kann, wirkt sich die Kultivierung von PDC in Gegenwart von IL-4, IL-10, TGF β und zum Teil auch mit TNF α negativ auf die Sekretion von IFN α aus. Die Th1-assoziierten Zytokine IL-12 und vor allem IFN γ begünstigten dagegen die Produktion von IFN α . Um sicherzustellen, dass der Effekt von anti-BDCA-2 auf die Sekretion von Zytokinen nicht auf die Induktion der Reifung oder die Toxizität von AC144 zurückzuführen ist, wurden der prozentuale Anteil lebender Zellen und das Ausprägungsniveau einiger Aktivierungsmarker (CD80, CD83, CD86 etc.) nach unterschiedlicher Kultivierungsdauer in Gegenwart und Abwesenheit von anti-BDCA-2 mAk untersucht. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

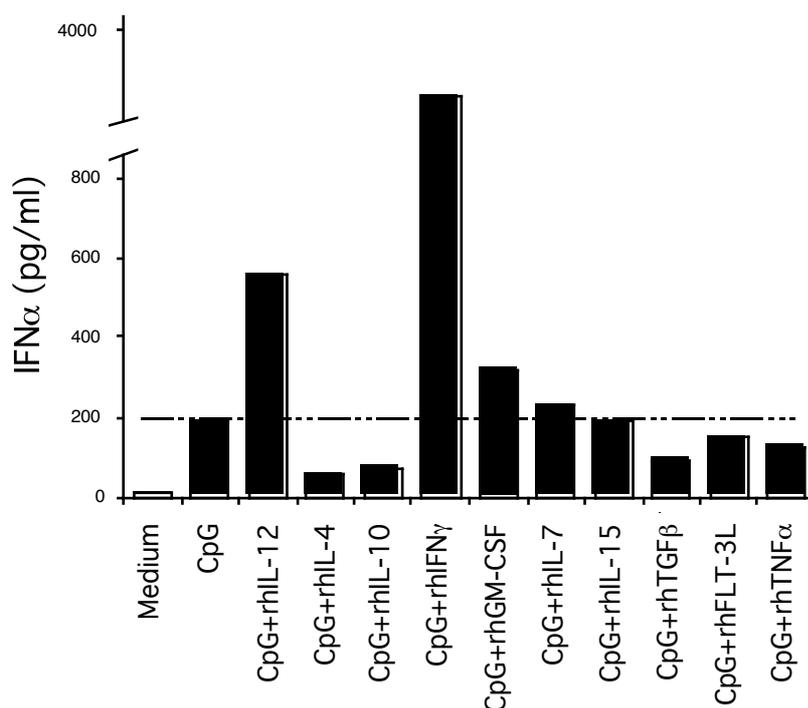


Abbildung 3.26: Th1-assoziierte Zytokine IL-12 und IFN γ verstärken, IL-4, IL-10, TGF β und TNF α inhibieren dagegen die CpG-induzierte Sekretion von IFN α bei PDC. Aufgereinigte PDC wurden 24 h in Gegenwart von IL-3 und weiteren Zytokinen, wie im Diagramm beschrieben, kultiviert. Die unterbrochene Linie markiert die Konzentration von IFN α , die in Abwesenheit von exogenen Zytokinen sezerniert wurde.

3.4.6 Auswirkung der Vorkultivierung von PDC in Gegenwart von anti-BDCA-2 mAk auf die IL-12-Produktion nach der anschließenden Stimulation mit CpG-DNA und CD40-Ligand

Aufgereinigte (>97%) PDC wurden für 72 h in Gegenwart von IL-3 (10 ng/ml) kultiviert, gewaschen und für 48 h mit CpG-DNA (ODN 2216), CD40-Ligand transfizierten J558L-Zellen oder mit CpG-DNA (ODN 2216) + CD40-Ligand-transfizierten J558L-Zellen restimuliert. Das sezernierte, bioaktive IL-12 p70 wurde mittels spezifischen ELISA nachgewiesen. Das meiste IL-12 p70 wurde von den PDC produziert, wenn die Zellen mit CpG-DNA + CD40-Ligand-transfizierten J558L-Zellen stimuliert wurden. Stimulation nur mit den CD40-Ligand-transfizierten J558L-Zellen hatte eine schwächere IL-12 p70-

Sekretion zur Folge. Nichtsdestotrotz war die CD40-Ligation auf den PDC für die IL-12 p70-Sekretion essentiell, da CpG-DNA allein keine IL-12 p70-Sekretion induzierte (Abbildung 3.27 A).

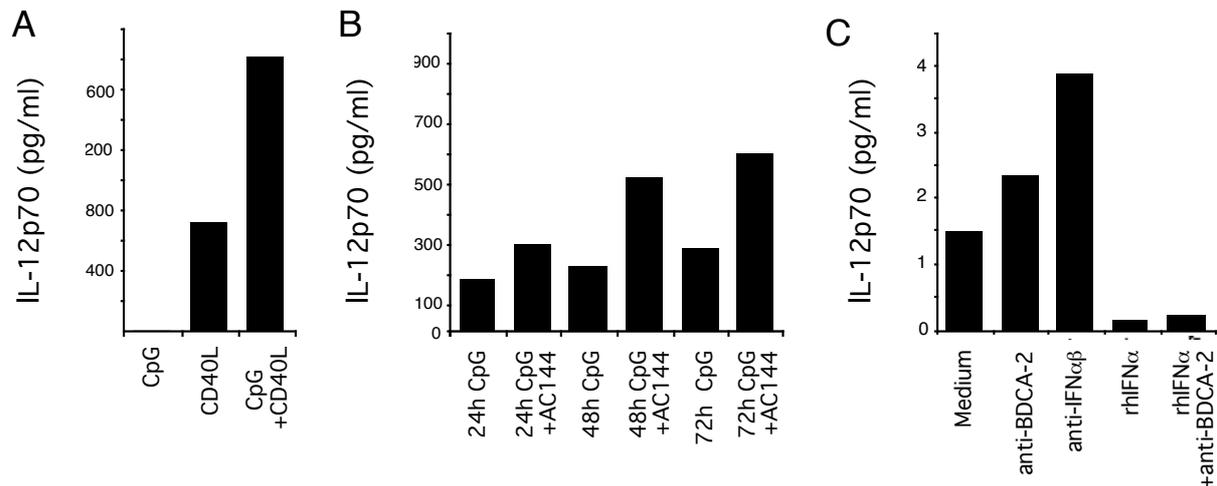


Abbildung 3.27: Bindung von mAk AC144 an BDCA-2 inhibiert spezifisch die IFN α -Sekretion und verstärkt dadurch die IL-12-Produktion bei PDC. (A) Aufgereinigte PDC wurden in Gegenwart von IL-3 (10 ng/ml) 72 h kultiviert, gewaschen und anschließend weitere 48 h, wie im Diagramm beschrieben, kultiviert. (B) Aufgereinigte PDC wurden, wie im Diagramm beschrieben, kultiviert, gewaschen und anschließend 48 h in Gegenwart von bestrahlten CD40L-transfizierten J558L-Zellen (Verhältnis 1:10, J558L:PDC) und 2 μ g/ml CpG-DNA (ODN 2216) kultiviert. (C) Aufgereinigte PDC wurden für 48 h in Gegenwart von IL-3 (10 ng/ml) und anderen Faktoren, wie im Diagramm beschrieben, kultiviert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und weitere 48 h in Gegenwart von bestrahlten, CD40L-transfizierten J558L-Zellen (Verhältnis 1:10, J558L:PDC) und 2 μ g/ml CpG-DNA (ODN 2216) kultiviert. Dargestellt sind Konzentrationen von IL-12 p70, die in den Kulturüberständen gemessen wurden.

Die Menge des sezernierten IL-12 p70 war abhängig von der Dauer der Vorkultur mit IL-3 und erreichte ihr Maximum nach \sim 72 h. Die Zugabe von anti-BDCA-2 mAk AC144 während der Vorkultivierung mit IL-3 verstärkte die spätere Sekretion von IL-12 p70 im Vergleich zur Vorkultivierung mit IL-3 allein (Abbildung 3.27 B). Diese Verstärkung trat unabhängig von der Dauer

der Vorkultivierung auf und wurde nicht direkt durch die BDCA-2-Ligation induziert, sondern war auf die BDCA-2-vermittelte Inhibition der IFN α -Sekretion zurückzuführen. Dies resultierte aus den Tatsachen, dass die Verstärkung der IL-12 p70-Sekretion auch durch die Vorkultivierung mit dem neutralisierenden anti-IFN- α/β polyklonalen Ak erreicht wurde, und dass das rekombinante IFN α die IL-12-Sekretion nahezu 100%-ig inhibierte. Zusätzlich konnte die BDCA-2-Ligation den inhibierenden Effekt von rekombinantem IFN α nicht aufheben (Abbildung 3.27 C).

3.4.7 Auswirkung der Bindung von AC144 mAk an BDCA-2 auf die Th-Zellpolarisation nach Stimulation mit allogenen PDC

Aufgereinigte (>98%) PDC wurden für 3 h in Gegenwart von IL-3 (10 ng/ml) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, um das IL-3 aus dem Medium zu entfernen, und mit allogenen CD4⁺ CD45RA⁺ CD45RO⁻ naiven T-Zellen aus peripherem Blut kokultiviert. Nach der Restimulation mit PMA und Ionomycin war der Anteil an IFN γ - und IL-4-produzierenden T-Zellen annähernd gleich (Abbildung 3.28 A). Diese Ausgangsbedingungen wurden gewählt, um später eine Änderung der T-Zell-Antwort in beide Richtungen (Th1 und Th2) deutlich beobachten zu können. Die Zugabe von anti-BDCA-2 mAk AC144 während der Stimulationsphase hatte eine schwache Verschiebung der T-Zell-Polarisation in Richtung Th2 zur Folge (der prozentuale Anteil an IL-4-Alleinproduzenten stieg von 14,8% auf 23,5%, und der prozentuale Anteil an IFN γ -Alleinproduzenten sank von 20,9% auf 12,2%). Die Ursache für die nur schwache Th2-Polarisation war die erhöhte IL-12 p70-Sekretion der PDC aufgrund der BDCA-2 vermittelten Inhibition der IFN α -Sekretion (Kapitel 3.4.6). Das sezernierte IL-12 p70 induzierte IFN γ -produzierende T-Zellen und kompensierte auf diese Weise das inhibierte IFN α . Dies ist auch aus der Tatsache ersichtlich, dass die BDCA-2-induzierte Verschiebung der T-Zell-Polarisation in Richtung Th2 viel stärker ausgeprägt war, wenn das IL-12 p70

durch spezifische mAk neutralisiert wurde (der prozentuale Anteil an IL-4-Alleinproduzenten stieg von 18,9% auf 37,5%, und der prozentuale Anteil an IFN γ -Alleinproduzenten sank von 17,8% auf 5,7%; Abbildung 3.28 A). Die alleinige Neutralisierung von IL-12 beeinflusste die T-Zell-Polarisation nur unwesentlich, wogegen die Neutralisierung von IFN α unabhängig von der BDCA-2-Ligation eine starke Th2-Polarisierung induzierte.

Die BDCA-2-induzierte Th2-Polarisierung war auf die reduzierte Zahl der IFN γ -produzierenden T-Zellen und nicht auf die Zunahme IL-4-produzierender T-Zellen zurückzuführen. Man beachte, dass die Gesamtzahl der IL-4-Produzenten (IL-4-Alleinproduzenten + IL-4/IFN γ -Doppelproduzenten) auch dann gleich blieb, wenn AC144 zugegeben wurde (Abbildung 3.28 A).

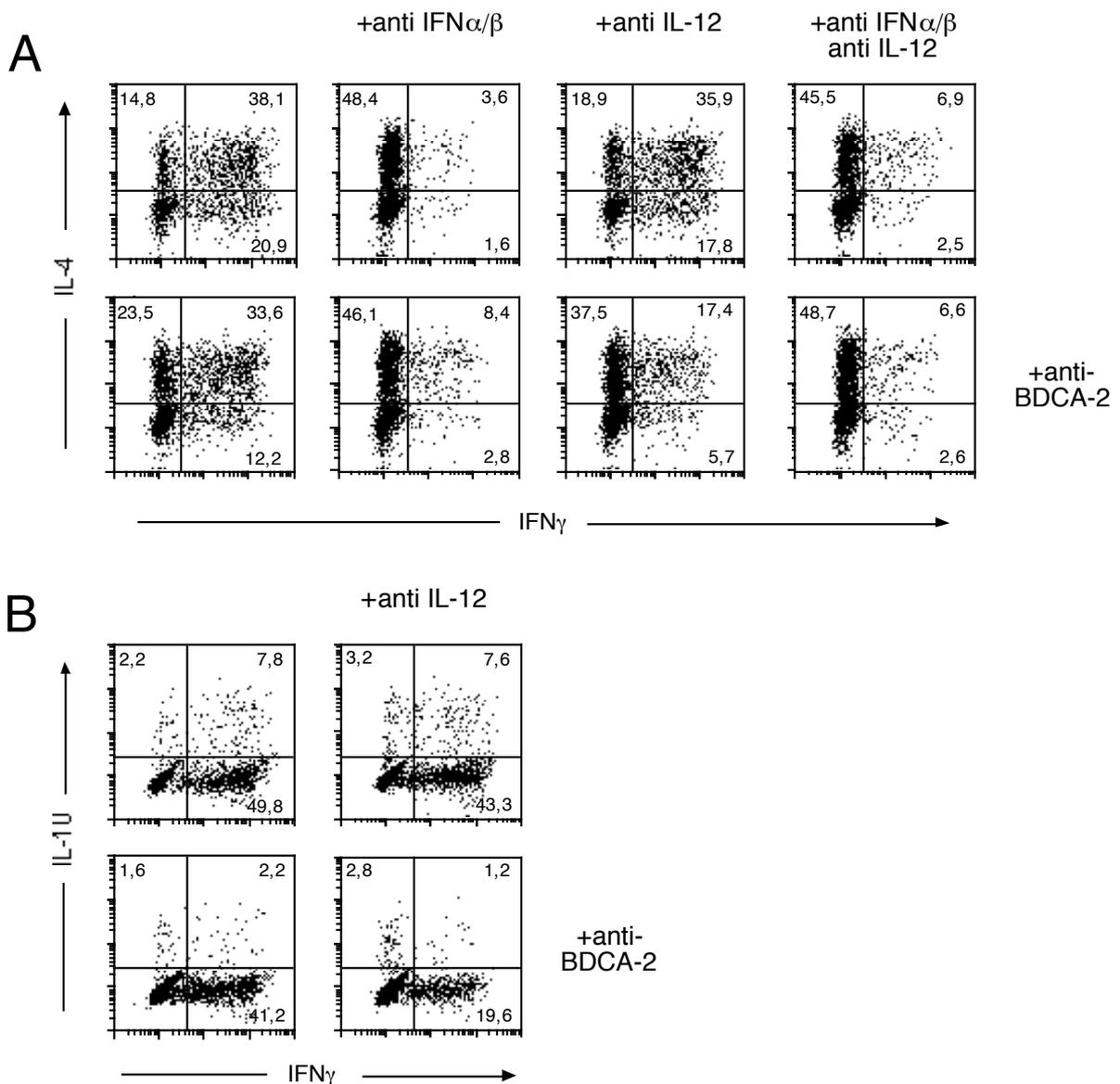


Abbildung 3.28: Die Ligation von BDCA-2 mit dem mAk AC144 induziert eine leichte Verschiebung der Th-Polarisation in Richtung Th1 (weniger IFN γ ⁺ Th-Zellen) und reduziert die Zahl von IL-10/IFN γ -produzierenden Th-Zellen: Aufgereinigte PDC wurden 24 h in Gegenwart von IL-3 (10 ng/ml) kultiviert und anschließend 6 Tage mit naiven CD4⁺ T-Zellen (im Verhältnis von 1:10, PDC:T-Zellen) kokultiviert. Der Effekt von IFN α/β und IL-12 wurde mit neutralisierenden Ak, wie in der Abbildung beschrieben, inhibiert. Anschließend wurden die T-Zellen mit PMA und Ionomycin restimuliert und die Produktion von IFN γ , IL-4 und IL-10 mittels intrazellulärer Färbung bestimmt. Die Zahlen zeigen den prozentualen Anteil an Zellen in dem jeweiligen Quadranten.

Eine starke Th2-Polarisation konnte unabhängig davon beobachtet werden, ob BDCA-2 ligiert oder IFN α/β und IL-12 neutralisiert wurden, wenn die PDC vor der Kokultivierung mit naiven T-Zellen 6 Tage in Gegenwart von bestrahlten CD40L-transfizierten J558L-Zellen (Verhältnis 1:10, J558L:PDC) kultiviert wurden (Abbildung 3.29). Die Zahl der IL-10/IFN γ -produzierenden T-Zellen sank in Abhängigkeit von der BDCA-2-Ligation. Im Gegensatz zu IL-4 nahm die Zahl der IL-10-Aleinproduzenten gleichzeitig nicht zu (der prozentuale Anteil an IL-10/IFN γ -Produzenten sank von 7,8% bzw. 7,6% auf 2,2% bzw. 1,2%, und der prozentuale Anteil an IL-10-Aleinproduzenten sank von 2,2% bzw. 3,2% auf 1,6% bzw. 2,8%; Abbildung 3.28 B). Dieser Effekt war unabhängig davon, ob IL-12 neutralisiert wurde oder nicht.

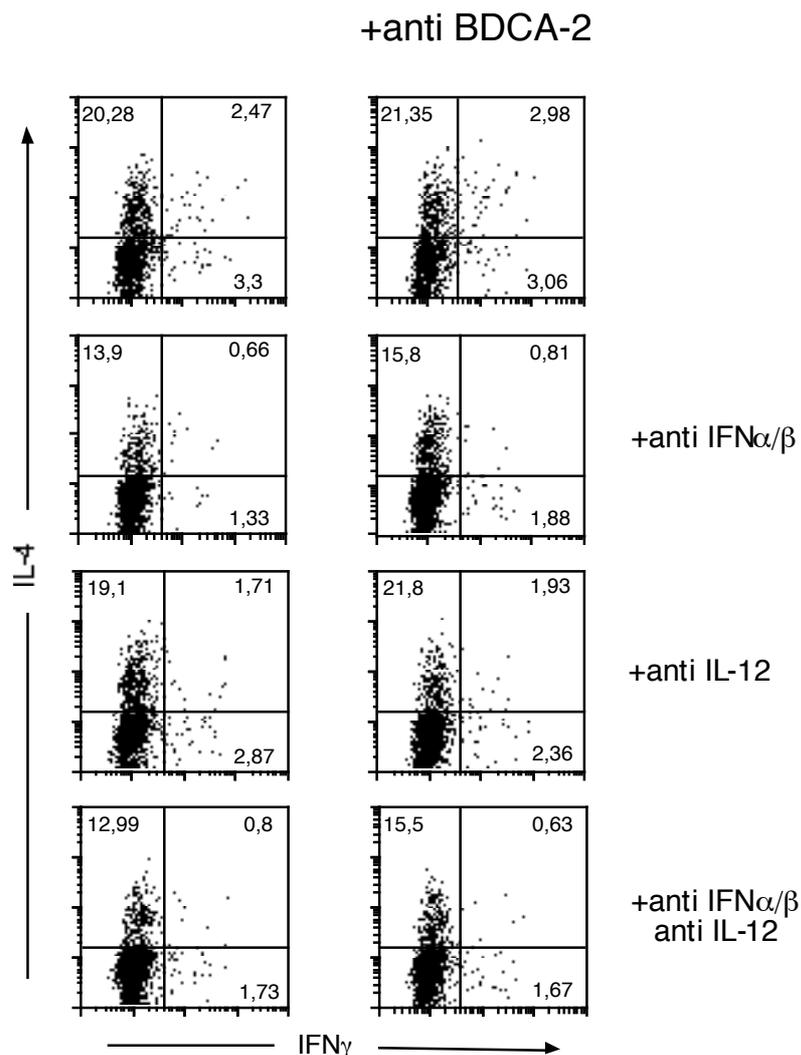


Abbildung 3.29: PDC induzieren eine starke Th2-Polarisation, wenn sie 6 Tage in Gegenwart von bestrahlten CD40L-transfizierten J558L-Zellen vorkultiviert werden. Aufgereinigte PDC wurden 6 Tage in Gegenwart von bestrahlten CD40L-transfizierten J558L-Zellen kultiviert und anschließend 6 Tage mit naiven CD4⁺ T-Zellen (im Verhältnis von 1:10, PDC:T-Zellen) kokultiviert. Der Effekt von IFN α/β und IL-12 wurde mit neutralisierenden Ak, wie in der Abbildung beschrieben, blockiert. Nach der Restimulation mit PMA und Ionomycin wurde die Produktion von IFN γ und IL-4 mittels intrazellulärer Färbung bestimmt. Die Zahlen zeigen den prozentualen Anteil an Zellen in dem jeweiligen Quadranten.

Eine starke Th1-Polarisation wurde induziert, wenn die PDC bei der Kokultivierung mit naiven CD4⁺ T-Zellen zusätzlich mit FLU oder den Komplexen aus anti-ss/dsDNA mAk MER-3 und unmethylierten Plasmid-DNA pcDNA3 stimuliert wurden. Hier hatte die Ligation von BDCA-2 keinen Einfluß auf die Th-Polarisation, und auch die Neutralisierung von IFN α/β induzierte nur wenige IL-4-produzierende T-Zellen (Abbildung 3.30).

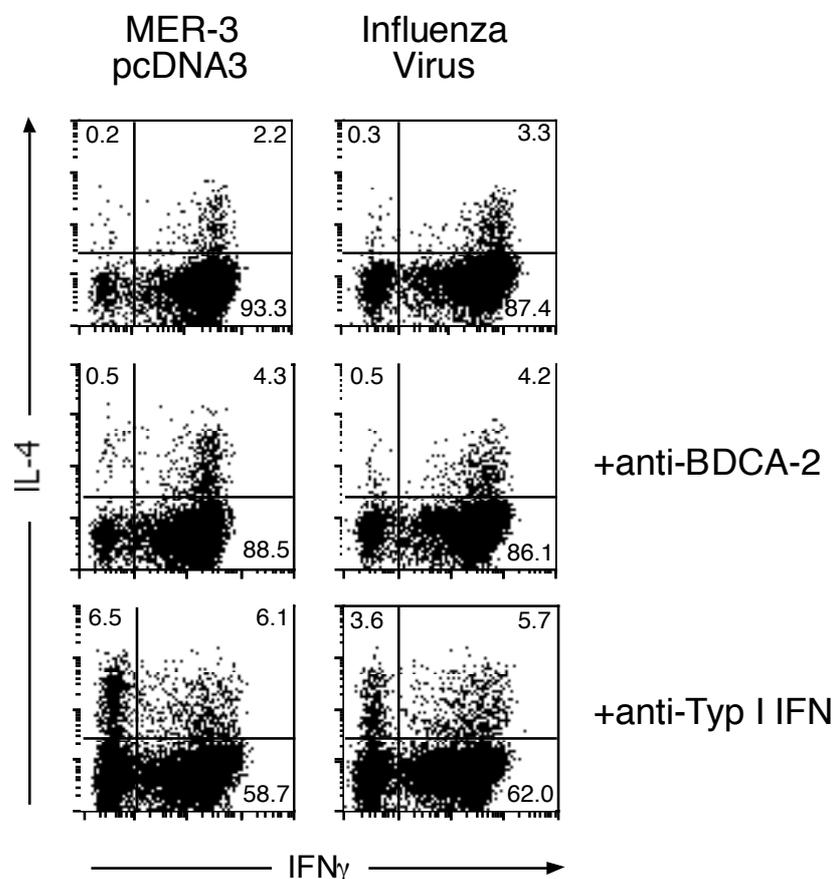


Abbildung 3.30: PDC induzieren eine starke Th1-Polarisation nach einer Stimulation mit Influenza-Virus oder Komplexen aus anti-ss/dsDNA und unmethylierter DNA. Aufgereinigte PDC wurden in Gegenwart von FLU und Komplexen aus anti-ss/dsDNA und unmethylierter DNA 6 Tage mit naiven CD4⁺ T-Zellen (im Verhältnis von 1:10, PDC:T-Zellen) kokultiviert. Der Effekt von IFN α/β wurde mit neutralisierenden Ak, wie in der Abbildung beschrieben, blockiert. Nach der Restimulation mit PMA und Ionomycin wurde die Produktion von IFN γ und IL-4 mittels intrazellulärer Färbung bestimmt. Die Zahlen zeigen den prozentualen Anteil an Zellen in dem jeweiligen Quadranten.

4 Diskussion

4.1 Subtraktive Immunisierung

Bei dem Versuch, mAk gegen unbekannte Antigene zu generieren, die spezifisch auf bestimmten Zellen ausgeprägt sind, ist man gezwungen, ganze Zellen als Ag-Quelle zu verwenden. Dies erhöht die Gefahr, dass die gewünschte Immunantwort von Immunantworten gegen stark immunogene Ag überlagert wird und letztendlich nicht detektiert werden kann. Die Tatsache, dass DC eine Reihe von stark immunogenen Ag ausprägen, die auch von anderen Leukozyten ausgeprägt werden, ist vermutlich der Grund dafür, dass es in der Vergangenheit nicht gelungen ist, mAk zu generieren, die spezifisch DC erkennen. Andererseits liegt die Vermutung nahe, dass, falls es DC-spezifische Ag gibt, diese höchstwahrscheinlich schwach immunogen sind. Um dieses Problem zu umgehen, versuchten viele Forscher im Vorfeld einer Immunisierung mit DC eine Toleranz gegen die DC-unspezifischen, stark immunogenen Ag zu induzieren. Die zwei bekanntesten Methoden sind hier die Cyclophosphamid-Behandlung (O'Doherty et al., 1993) und die neonatale Tolerisierung (Yamaguchi et al., 1995). In dieser Arbeit wurde eine erst vor kurzem beschriebene Methode der kontralateralen Immunisierung angewandt (Yin et al., 1997). Diese Methode basiert auf der Tatsache, dass naive T- und B-Zellen konstitutiv in die peripheren lymphatischen Organe rezirkulieren (Picker et al., 1992; Butcher et al., 1996; Bradley et al., 1996; Watson et al., 1998), sich aber sofort dort ansiedeln, sobald sie ein Ag erkennen und aktiviert werden (Kearney et al., 1994; Jacob et al., 1992; Ridderstad et al., 1998; Tarlinton et al., 1998). Macht man sich dies zu Nutze und injiziert Mäusen lokal ein Ag, wird es von den APC aufgenommen und in dem benachbarten LN den B- und T-Zellen präsentiert. Lymphozyten, die dagegen reaktiv sind, werden anschließend in diesem LN zurückgehalten. Auf diese Weise kommt es zur Abreicherung Ag-spezifischer Zellen in der Zirkulation und dadurch zu einer Art lokaler Toleranz in anderen Körperregionen.

In dieser Arbeit wurden Bristol-8-Zellen (B-Lymphoblastoma-Zelllinie) in die rechte hintere Pfote einer Maus am Tag -3 injiziert. Diese Zellen prägen eine Vielzahl stark immunogener Ag aus, wie zum Beispiel die Moleküle der MHC-Familie, die auch auf den BDC präsent sind. Am Tag 0 wurde die Injektion mit Bristol-8-Zellen wiederholt und zusätzlich wurden aufgereinigte humane BDC in die linke hintere Pfote injiziert. Zwischen den Tagen -3 und 0 sollten die meisten naiven T- und B-Zellen, die reaktiv gegen die Bristol-8-spezifischen Ag sind, in dem rechten poplitealen LN zurückgehalten werden. Zum Zeitpunkt der zweiten Injektion sollte es demnach möglich sein, in der linken hinteren Pfote eine Immunantwort gegen weniger immunogene Ag zu induzieren, die auf den BDC, aber nicht auf den Bristol-8-Zellen ausgeprägt werden. Die lokale Trennung der beiden Immunantworten wurde durch die mehrfache Wiederholung der Injektion von Bristol-8-Zellen in die rechte und von BDC in die linke, hintere Pfote aufrecht erhalten. Interessanterweise wurden neben den BDC-spezifischen mAk viele andere generiert, die für weit verbreitete Ag spezifisch waren (z.B. CD4, CD33, CD45, HLA-DR, CD123). Dies ist zum einen dadurch zu erklären, dass einige dieser Ag von den Bristol-8-Zellen nicht ausgeprägt werden, zum anderen aber ist es ein Indiz dafür, dass die lokale Injektion eines Ag keine 100%-ige Toleranz in den übrigen Körperregionen garantiert. Da die Ausgangsfrequenz von Ag-spezifischen Lymphozyten die Stärke einer Immunantwort entscheidend beeinflusst, kann ihre Senkung zur Folge haben, dass die Immunantwort von anderen Spezifitäten dominiert wird. Es wäre also denkbar, dass eine 100%-ige Toleranz gegen stark immunogene Ag nicht unbedingt notwendig ist, damit eine Immunantwort gegen andere, schwach immunogene Ag detektiert werden kann.

4.2 Ausprägungsmuster von CD1c, BDCA-2, BDCA-3 und BDCA-4 und Eigenschaften der einzelnen Subpopulationen von BDC

Mit der oben genannten Immunisierungstechnik wurde eine Reihe von mAk generiert, die humane BDC erkennen. Die meisten von ihnen erkennen neben den BDC auch andere Zelltypen innerhalb der PBMC. Bei einer Gruppe dieser mAk konnte allerdings eine hohe Spezifität für unterschiedliche Subpopulationen (O'Doherty et al., 1994; Kohrgruber et al., 1999; Ito et al., 1999) von BDC festgestellt werden. Diese mAk erkennen folgende Ag: CD1c, BDCA-2, BDCA-3 und BDCA-4 (Dzionic et al., 2000). Zwei von diesen Ag, BDCA-2 und BDCA-4, werden in humanem Vollblut ausschließlich von CD123⁺CD11c⁻ PDC ausgeprägt. Unsere Ergebnisse hinsichtlich Frequenz, Immunophänotyps, Morphologie, endozytotischer Kapazität und Reifung von BDCA-2⁺ BDCA-4⁺ Zellen aus dem Blut stimmen mit den Daten aus den meisten früheren Arbeiten über PDC überein (O'Doherty et al., 1994; Olveus et al., 1997; Kohrgruber et al., 1999; Robinson et al., 1999). Dies zeigt deutlich, dass sowohl BDCA-2- als auch BDCA-4-spezifische Marker für die PDC im Blut sind. Während das Ausprägungsmuster von BDCA-2 auch in anderen Geweben auf PDC beschränkt ist, wird BDCA-4 zumindest in den Tonsillen zusätzlich von einer CD57⁺ CXCR5⁺ Subpopulation von T-Zellen (follikuläre B-Helfer Gedächtnis-T-Zellen (T_{FH}); Bowen et al., 1991; Breitfeld et al., 2000) ausgeprägt. Eine schwache Ausprägung von BDCA-4 konnte weiterhin auf einem kleinen Teil naiver CD3⁺ CD45RA⁺ T-Zellen nach 24 h Stimulation mit PMA und Ionomycin beobachtet werden. Weitere Unterschiede in der Ausprägung zwischen BDCA-2 und BDCA-4 gibt es bei den *in vitro* generierten DC. BDCA-4 wird von imMO-DC (Sallusto et al., 1994; Pickl et al., 1994) und DC, die aus CD34⁺ hämatopoietischen Vorläuferzellen (Caux et al., 1992) generiert wurden, ausgeprägt. BDCA-2 konnte dagegen auf diesen Zellen nicht nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass BDCA-4 im Blut nur auf PDC nachgewiesen werden kann, deutet darauf hin, dass es im humanem Blut kein Pendant zu den *in vitro* generierten BDCA-4⁺ DC gibt. Das

Ausprägungsniveau von BDCA-4 auf den PDC wird nach IL-3 abhängiger Reifung eher erhöht, während BDCA-2 nach der gleichen Kultivierung vollständig runterreguliert wird. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass BDCA-4 im Gegensatz zu BDCA-2 bereits nach 12 h Kultivierung von CD11c⁺ BDC ausgeprägt wird. Die Ausprägungskinetik von BDCA-2 zeigt Parallelen zur Ausprägungskinetik vieler Ag-Aufnahmerezeptoren, wie zum Beispiel Langerin und Mannose-Rezeptor, deren Ausprägungsniveau in Folge der DC-Reifung ebenso runterreguliert wird (Valladeau et al., 2000; Kato et al., 2000). Die Erhöhung des Ausprägungsniveaus von BDCA-4 in Folge von Reifung ist wiederum typisch für viele Adhäsions- und Kostimulationsmoleküle wie ICAM-1 (CD54), LFA-3 (CD58), B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86). Die mögliche Funktion beider Ag wird zu einem späteren Zeitpunkt ausführlich diskutiert.

Anders als BDCA-2 und BDCA-4 ist die Ausprägung von BDCA-3 auf eine kleine Population von CD1c⁻ CD11c⁺ CD123⁻ BDC beschränkt. Diese Zellpopulation zeigt in Bezug auf ihren Phänotyp, Morphologie und endozytotische Kapazität sowie die Bedingungen, die sie für ihre Reifung benötigt, viele Ähnlichkeiten mit den CD1c⁺ CD11c⁺⁺ CD123^{+/-} BDC. Bei der phänotypischen Analyse stellte sich heraus, dass die CD1c⁺ BDC im Gegensatz zu den BDCA-3⁺ BDC die Fc-Rezeptoren CD32, CD64 und FcεRI als auch den LFA-3-Liganden (CD2) ausprägen. Die Tatsache, dass die BDCA-3⁺ BDC keine Fc-Rezeptoren ausprägen, lässt vermuten, dass sie nicht in der Lage sind, Immunkomplexe aufzunehmen (Sallusto et al., 1994; Fanger et al., 1996; Maurer et al., 1996). Da die DC im Laufe der Reifung die Fähigkeit zur Ag-Aufnahme verlieren und die Ausprägung vieler Ag-Aufnahmerezeptoren runterregulieren (Sallusto et al., 1994), könnten BDCA-3⁺ BDC prinzipiell ein Reifungsstadium der CD1c⁺ BDC darstellen. Dafür spricht auch die Tatsache, dass die CD1c⁺ BDC nach kulturinduzierter Reifung BDCA-3 ausprägen. Da allerdings auch IL-3-stimulierte, BDCA-2⁺ PDC BDCA-3 ausprägen, könnten auch sie ein Vorläuferstadium von BDCA-3⁺ BDC repräsentieren. Ito und Mitarbeiter haben zusätzlich gezeigt, dass die CD1c⁺ BDC im Gegensatz zu

den BDCA-3⁺ BDC die Merkmale von Langerhans-Zellen (Ausprägung von Lag, E-cadherin, Langerin und Ausbildung von Birbeck-Körperchen) ausprägen können, wenn sie in Gegenwart von GM-CSF, IL-4 und TGF- β 1 kultiviert werden (Ito et al., 1999). Sollten BDCA-3⁺ BDC tatsächlich eine Differenzierungsstufe von CD1c⁺ BDC repräsentieren, würde dies bedeuten, dass sie die Differenzierungsfähigkeit zu Langerhans-Zellen bereits verloren haben. Ob zwischen den drei BDC-Populationen ein phylogenetischer Zusammenhang besteht, bleibt allerdings unklar. In der gleichen Arbeit wird von Ito et al. behauptet, dass die CD11c⁺⁺ CD123^{+/-} BDC CD1a ausprägen. Dies steht im Widerspruch zu unserer Beobachtung. Die Autoren benutzten für den Nachweis der CD1a-Ausprägung zwei unterschiedliche mAk (Klon BL-6 und B-B5) und konnten einen deutlichen Unterschied in der Helligkeit der Färbung beobachten (B-B5 färbte heller). Die Färbung mit dem mAk B-B5 konnte zwar von uns reproduziert werden, allerdings zeigt weder der anti-CD1a mAk BL-6 noch der anti-CD1a mAk HI149 auf den CD1c⁺ BDC eine Färbung. Zusätzlich färbt der mAk B-B5 im Gegensatz zu BL-6 und HI149 eine signifikante Subpopulation CD19⁺ B-Zellen aus dem peripheren Blut. Dieses Färbemuster (CD11c⁺⁺ CD123^{+/-} BDC + Subpopulation von CD19⁺ B-Zellen) ist eher charakteristisch für eine CD1c⁻ als eine CD1a-Färbung. Weiterhin konnte von uns gezeigt werden, dass der CD1c mAk AD5-8E7 die Bindung von B-B5 an die CD1a⁺ MOLT-4-Zellen vollständig blockiert. Dies alles deutet darauf hin, dass B-B5 CD1c und nicht CD1a erkennt, und dass die CD1c⁺ BDC kein CD1a ausprägen.

Die phänotypische Charakterisierung von CD1c⁺ BDC ergab weiter, dass diese Zellen zum Teil CD14 ausprägen. Interessanterweise ist das Ausprägungsniveau von CD14 innerhalb der Population sehr variabel und verhält sich umgekehrt proportional zum Ausprägungsniveau von CD1c und CD2 (Ergebnisse nicht gezeigt). Crawford et al. konnten beobachten, dass eine Subpopulation von CD14⁺ Monozyten CD2 ausprägt (Crawford et al., 1999). Zusätzlich wurde von der gleichen Arbeitsgruppe gezeigt, dass diese

Subpopulation in Gegenwart von GM-CSF und IL-4 wesentlich schneller zu reifen DC differenziert als die CD14⁺ CD2⁻ Monozyten. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit dem linearen Differenzierungsmodell, bei dem die CD1c⁺ CD2⁺ CD14⁻ BDC sich aus den CD1c⁻ CD2⁻ CD14⁺ Monozyten entwickeln. Die CD1c⁻ CD2⁺ CD14⁺ Monozyten und die CD1c⁺ CD2⁺ CD14⁺ BDC könnten in diesem Modell die jeweiligen Entwicklungsstufen repräsentieren.

4.3 Molekulare Struktur und Funktion von BDCA-4

Die molekulare Identifizierung von BDCA-4 mittels Immunopräzipitation und MALDI-TOF Massen-Spektrometrie ergab, dass BDCA-4 identisch mit dem neuronalen Rezeptor Neuropilin-1 ist. Dieser Befund wurde zusätzlich mittels Immunopräzipitation aus Neuropilin-1-transfizierten Zellen bestätigt (Dzionic et al., 2002).

Neuropilin-1 ist ein Rezeptor für neuronale Wachstumsfaktoren der Klasse-3-Semaphorin-Subfamilie und spielt eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von neuronalen Axonen (Kolodkin et al., 1997; He et al., 1997). Auch endotheliale und Tumor-Zellen prägen Neuropilin-1 aus. Auf diesen Zellen fungiert Neuropilin-1 als Rezeptor für VEGF₁₆₅ (vascular endothelial growth factor; Soker et al., 1998) und ist maßgebend an der Angiogenese beteiligt (Takashima et al., 2002). Tordjman et al. berichteten kürzlich, dass Neuropilin-1 aufgrund homophiler Bindung eine Rolle bei der Ausbildung immunologischer Synapsen zwischen naiven T-Zellen und den DC spielt (Tordjman et al., 2002). Diese Hypothese basiert auf der Beobachtung, dass Neuropilin-1 mit Hilfe von PCR und Westernblot in den imMo-DC und T-Zellen aus dem Blut nachgewiesen werden konnte und dass Ak gegen Neuropilin-1 die Bildung von Aggregaten zwischen den naiven T-Zellen und den imMo-DC inhibieren. Zusätzlich wurde von den Autoren gezeigt, dass die von den imMo-DC induzierte allogene T-Zell-Proliferation mit Hilfe oben genannter anti-Neuropilin-1 Ak inhibiert werden kann. Da Neuropilin-1 auf allen bis jetzt getesteten DC nach einer *in vitro*-Aktivierung ausgeprägt wird und auch

einige *in vitro* aktivierte T-Zellen Neuropilin-1 ausdragen (Dzionic et al., 2000 und 2002), ist eine Mitwirkung von Neuropilin-1 bei der T-Zell-Aktivierung nicht auszuschließen. In Anbetracht unserer Ergebnisse erscheint diese Hypothese jedoch relativ unwahrscheinlich. Mit Hilfe von anti-Neuropilin-1 mAk AD5-17F6 können weder die CD45RA⁺ naiven noch die CD45RO⁺ Gedächtnis-T-Zellen aus dem peripheren Blut gefärbt werden. Im Gegensatz dazu wird Neuropilin-1 von einem Teil dieser Zellen nach einer *in vitro*-Aktivierung ausgeprägt (Dzionic et al., 2002). Naive T-Zellen in den Tonsillen prägen kein Neuropilin-1 aus, allerdings wird es von einer kleinen Subpopulation tonsillärer Gedächtnis-T-Zellen ausgeprägt, deren Immunophänotyp mit dem der T_{FH}-Zellen identisch ist. Schließlich wird Neuropilin-1 in den Tonsillen von PDC ausgeprägt, wohingegen andere DC-Populationen, wie die CD83⁺ interdigitierenden DC (IDC), Neuropilin-1 nicht ausdragen. Sollte Neuropilin-1 tatsächlich eine wichtige Rolle bei der Ausbildung einer immunologischen Synapse zwischen naiven T-Zellen und den DC spielen, wäre zu erwarten, dass es auch von IDC ausgeprägt wird, da sie die Hauptkandidaten für die Aktivierung naiver T-Zellen in den Tonsillen sind. Es wäre allerdings denkbar, dass eine homophile Bindung von Neuropilin-1 eine Rolle bei der Interaktion zwischen den PDC und den T_{FH}-Zellen spielt. Man könnte spekulieren, dass T_{FH}-Zellen nach der Immigration aus der Zirkulation in die T-Zell-reiche Zone durch die PDC aktiviert werden und dabei das Ausprägungsniveau von Neuropilin-1 hochregulieren. Da nicht alle CD57⁺ T_{FH}-Zellen Neuropilin-1 ausdragen, ist es möglich, dass die T_{FH}-Zellen auf dem Weg aus der T-Zell-reichen Zone in die B-Zell-Follikel Neuropilin-1 runterregulieren. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, dass ein Teil der *in vitro* aktivierten T-Zellen Neuropilin-1 anscheinend nur transient ausdragen, wobei das Ausprägungsmaximum nach 24 h erreicht wird (Ergebnisse nicht gezeigt). Ob die Ausprägung von Neuropilin-1 auf T_{FH}-Zellen nur auf die T_{FH}-Zellen in der T-Zell-reichen Zone beschränkt ist, muß allerdings noch gezeigt werden.

Eine weitere mögliche Funktion von Neuropilin-1 beobachtet man bei endothelialen Zellen. Bei diesen Zellen verstärkt Neuropilin-1 die VEGF₁₆₅-abhängige Chemotaxis, indem es die Bindung von VEGF₁₆₅ an den VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR-2/KDR) verstärkt (Soker et al., 2002). Dies erscheint sehr interessant in Anbetracht der Tatsache, dass viele Tumore VEGF₁₆₅ sezernieren, um die Angiogenese des Tumorgewebes zu induzieren. Zwar war es bis jetzt nicht möglich, KDR auf der Zelloberfläche von PDC nachzuweisen, jedoch konnte gezeigt werden, dass VEGF₁₆₅ an die PDC bindet (Ergebnisse nicht gezeigt). Sollten PDC auf VEGF₁₆₅ chemotaktisch reagieren, könnten sie eine wichtige Rolle bei antitumoralen Immunantworten spielen. Sie könnten sogar die ersten DC sein, die das Tumor-Gewebe infiltrieren, da sie die einzigen Zellen im Blut sind, die Neuropilin-1 konstitutiv ausdrücken.

4.4 Molekulare Struktur und Funktion von BDCA-3

Die molekulare Identifizierung von BDCA-3 mittels Immunopräzipitation und MALDI-TOF Massen-Spektrometrie ergab, dass BDCA-3 identisch mit Thrombomodulin (CD141) ist. Dieser Befund wurde zusätzlich mit Hilfe von immunofluoreszenter Markierung von Zelllinien, die mit CD141 transfiziert wurden, bestätigt (Gregor Winkels, nicht publizierte Ergebnisse).

Bei CD141 handelt es sich um einen Rezeptor des vaskulären Endothels, der mit Thrombin 1:1 Komplexe bilden kann (Esmon et al., 1987). Das Dimer kann Protein C in seine aktive Form überführen und hat damit die Funktion eines natürlichen Antikoagulans (Fulcher et al., 1984). Neben dem Endothelium wurde CD141 auch auf einigen Zellen des hämatopoietischen Systems wie neutrophilen Granulozyten, Thrombozyten und Monozyten gefunden. Das Ausprägungsniveau von CD141 auf diesen Zellen ist, verglichen mit dem Ausprägungsniveau auf CD1c⁻ CD11c⁺ CD123⁻ BDC, jedoch relativ niedrig. Thrombomodulin kommt zusätzlich in einer löslichen Form vor, ob diese allerdings von den CD1c⁻ CD11c⁺ CD123⁻ BDC sezerniert wird, muss noch gezeigt werden. Ebenso ist noch unklar, ob die gerinnungshemmende Wirkung

von Thrombomodulin die einzige Funktion ist, die das Molekül auf den BDC erfüllt.

4.5 Eigenschaften von BDCA-2 und der Einfluss auf die Funktion von PDC

Einzelne DC-Populationen sind in der Lage, Immunantworten gegen unterschiedliche Pathogene zu induzieren. Welche Ag dabei von den jeweiligen DC-Populationen als fremd bzw. gefährlich erkannt werden, hängt vom Ausprägungsmuster der Ag-spezifischen Rezeptoren ab (Kadowaki et al., 2001). Diese Rezeptoren erkennen nicht nur das Pathogen selbst, sondern bestimmen oft gleichzeitig die Art der Immunantwort, die von dem Pathogen induziert wird. Demzufolge können einzelne DC-Subpopulationen in Abhängigkeit von ihrem Ag-Rezeptorrepertoire sowohl eine humorale als auch eine zellvermittelte Immunantwort induzieren und nicht, wie bis vor kurzem angenommen, nur eine bestimmte Immunantwort (Kadowaki et al., 2000; Cella et al., 2000).

Zu den am besten charakterisierten Ag-Rezeptorfamilien, die von DC ausgeprägt werden, gehören die Toll-Like-Rezeptoren (TLR) und die Lektine. Beide Rezeptorfamilien zeichnen sich dadurch aus, dass sie hochkonservierte mikrobielle Strukturen erkennen. TLR erkennen unter anderem Lipoproteine (TLR2), Lipopolysaccharide (TLR4) und bakterielle DNA (TLR9), wogegen die Lektine Kohlenhydratstrukturen auf Pathogenen erkennen (Jiang et al., 1995; Akira et al., 2001). In der letzten Zeit konnten vor allem viele neue, kalziumabhängige (C-Typ) Lektine identifiziert werden, die zuweilen sehr unterschiedliche Funktionen auf den DC erfüllen. Die Mitglieder der C-Typ-Lektin-Familie werden in zwei Gruppen unterteilt: (a) die Typ I C-Typ-Lektine mit multiplen CRD in der aminoterminalen extrazellulären Region und (b) Typ II C-Typ-Lektine mit einer CRD in der carboxyterminalen extrazellulären Region. Bei den Vertretern beider Gruppen konnte endozytische Aktivität

festgestellt werden (Bieber et al., 1992; Sallusto et al., 1995; Jiang et al., 1995; Valladeau et al., 2000).

Die Identifizierung von BDCA-2 mittels Ausprägungsklonierung ergab, dass es sich dabei um ein neues Typ II C-Typ-Lektin handelt, das spezifisch von den PDC ausgeprägt wird. Die Ligation von BDCA-2 mit dem spezifischen mAk resultiert in einer schnellen Internalisation des ganzen Komplexes. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das aufgenommene Ag (mAk AC144) in die Prozessierungs- und MHC II-Beladungskompartimente transportiert und später dem Ag-spezifischen T-Zell-Klon präsentiert wird (Dzionic et al., 2001; Peter Jähn, nicht publizierte Ergebnisse). Im Widerspruch zu diesen Ergebnissen enthält die intrazelluläre Domäne von BDCA-2 keine bekannten Internalisationsmotive, wie zum Beispiel das Dileucin-Motiv. Allerdings ist in dieser Domäne von BDCA-2 die sogenannte saure Triade (Glutaminsäure – Glutaminsäure – Glutaminsäure; EEE) enthalten. Dieses Motiv wurde bereits im Zusammenhang mit CD205 (DEC205) als essentiell für den Transport zu den späten Endosomen beschrieben (Mahnke et al., 2000). Das Vorhandensein dieses Motivs in der intrazellulären Region von BDCA-2 erklärt allerdings nicht den Internalisationsmechanismus. Interessanterweise führt die Ligation von BDCA-2 in keiner der getesteten BDCA-2-transfizierten Zelllinien zur Aufnahme des Komplexes. Parallel dazu ergibt die Immunopräzipitation von BDCA-2 aus diesen Zelllinien eine dominante Bande bei ~38 kD und eine weitere bei ~85 kD, wogegen Immunopräzipitationen aus PDC neben den zwei Banden eine zusätzliche Bande von 45 kD ergeben. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass ein assoziiertes Molekül für die ligandabhängige Internalisation von BDCA-2 verantwortlich sein könnte. Es konnte allerdings bisher nicht gezeigt werden, ob es sich bei der 45 kD-Bande um das entsprechende Protein handelt.

Die ermittelte Größe der Hauptbande von ~38 kD deutet zusätzlich auf einen hohen Glykosylierungsgrad von BDCA-2, das basierend auf der AS-Sequenz 25 kD groß sein sollte.

Die Funktion von C-Typ-Lektinen bei der Induktion und Modellierung von Immunantworten wird neben der intrazellulären Domäne entscheidend durch die Spezifität der Ag-Erkennungsdomäne bestimmt, die durch die CRD repräsentiert wird. Die CRD von BDCA-2 enthält das Glutamat–Prolin–Asparagin (EPN)-Motiv, das für die Erkennung von mannosehaltigen Kohlenhydraten verantwortlich ist (Weis et al., 1998). Es konnten allerdings bisher keine Kohlenhydratstrukturen identifiziert werden, die an BDCA-2 binden. Die Erkennung einer Zuckerstruktur durch das EPN-Motiv ist von der tertiären Struktur der CRD abhängig, so dass je nach AS-Sequenz dieser Domäne unterschiedliche Spezifitäten entstehen können. Dies wird besonders gut sichtbar anhand von Mannose-Rezeptor (CD206) und DC-SIGN (CD209), deren CRD das EPN-Motiv enthalten. Während CD206 hauptsächlich endständige Mannosereste erkennt, werden von DC-SIGN komplex zusammengesetzte Mannosereste erkannt (Mitchell et al., 2001; Feinberg et al., 2001; Geijtenbeek et al., 2002). In welcher Konstellation sich der Mannoserest befinden muss, damit es von BDCA-2 erkannt wird, und ob diese Struktur pathogenen Ursprungs ist, muss noch gezeigt werden.

BDCA-2 zeigt einen hohen Homologiegrad zu Maus DC-assoziiertem C-Typ-Lektin 2 (Dectin-2; 50,7% Identität auf der Aminosäureebene; Ariizumi et al., 2000), das auch als NKCL (natural killer Gen Komplex Lektin; Fernandes et al., 1999) bekannt ist. Die Exon-Intron-Anordnung von Dectin-2 und BDCA-2 sind nahezu identisch, was die Vermutung nahelegt, dass Dectin-2 das Maus-Homolog von BDCA-2 ist. Gegen diese Hypothese spricht die Entdeckung eines weiteren humanen Gens, das für ein Protein namens Tango 405 kodiert und einen noch höheren Homologiegrad zu Dectin-2 als BDCA-2 zeigt (Fraser et al., 2001). Ein weiteres Molekül, das eine große Ähnlichkeit mit BDCA-2 zeigt, ist das humane DCIR (dendritic cell immunoreceptor; 42,1% Identität auf der Aminosäureebene; Bates et al., 1999). Trotz des hohen Homologiegrades unterscheiden sich BDCA-2 und Dectin-2 erheblich von DCIR. Während in der intrazellulären Region von DCIR sich das

immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) befindet, fehlt es in den vergleichbar kurzen intrazellulären Domänen von BDCA-2 und Dectin-2. Auch das immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) und jedes andere bekannte Motiv, das in die Signaltransduktion involviert ist, fehlt bei BDCA-2 und Dectin-2. Anhand dieser Beobachtung schlussfolgerten Ariizumii und Mitarbeiter, dass Dectin-2 keinerlei signaltransduzierende Funktion besitzt. Im Fall von BDCA-2 konnte allerdings gezeigt werden, dass die Ligation von BDCA-2 mit dem spezifischen mAk AC144 zu einer schnellen und transienten Erhöhung der intrazellulären Kalziumionen-Konzentration führt. Dieser Prozess ist abhängig von den Protein-Tyrosin-Kinasen der src-Familie, was anhand der spezifischen Inhibition dieser Kinasen gezeigt werden konnte. Zusätzlich führt die Ligation von BDCA-2 zur Phosphorylierung von Tyrosin-Resten intrazellulärer Proteine. Dies impliziert, dass BDCA-2 trotz fehlender signaltransduzierender Motive eindeutig an Signalweiterleitung beteiligt ist. Der Mechanismus dieser Signalweiterleitung konnte zwar noch nicht aufgeklärt werden, allerdings könnten auch hier assoziierte Proteine eine wichtige Rolle spielen. Für diese Hypothese sprechen, wie schon bei den Versuchen zur Aufklärung des Internalisationsmechanismus, Ergebnisse, die mit Hilfe von BDCA-2-transfizierten Zelllinien erzielt wurden. Während PDC und BDCA-2-transfizierte U937-Zellen nach Ligation mit mAk AC144 einen Anstieg der intrazellulären Kalziumionen-Konzentration und die Protein-Tyrosin-Phosphorylierung intrazellulärer Proteine zeigten, konnten die oben genannten Anzeichen einer Signalweiterleitung bei BDCA-2-transfizierten Jurkat-Zellen nicht beobachtet werden. Ob es sich bei dem fehlenden Glied in der Signalkaskade um ein Protein handelt, das direkt mit BDCA-2 assoziiert ist, muss allerdings noch gezeigt werden.

4.6 Funktion von BDCA-2

Die bei weitem wichtigste Funktion von PDC ist ihre Fähigkeit, große Mengen IFN- α/β zu sezernieren in Antwort auf: (a) virale Infektion (Perussia et al.,

1985; Fitzgerald-Bocarsly et al., 1993; Siegal et al., 1999; Cella et al., 1999), (b) bakterielle Infektion (Svensson et al., 1996), (c) CpG-DNA (Kadowaki et al., 2001; Bauer et al., 2001), (d) dsRNA (Bauer et al., 2001) und (e) Serum von SLE-Patienten (Vallin et al., 1999; Dzionek et al., 2001). Die Ligation von BDCA-2 mit dem spezifischen mAk AC144 induziert eine nahezu vollständige Inhibition der Sekretion von IFN- α/β und zum Teil auch von TNF- α , wogegen die Sekretion von weiteren getesteten Zytokinen einschließlich IL-8 entweder nur sehr schwach oder gar nicht beeinflusst wird (Dzionek et al., 2001). Weiterhin hat die Ligation von BDCA-2 weder einen Einfluß auf die Vitalität noch auf die Reifung der PDC. Die Möglichkeit, dass die Inhibition der IFN- α/β -Sekretion die Folge einer kompetitiven Blockierung der Bindung von IFN- α/β -induzierenden Faktoren an den jeweiligen Rezeptor durch den mAk AC144 ist, erscheint aus folgenden Gründen unwahrscheinlich: (a) die IFN- α/β -Sekretion wird geblockt, auch wenn der mAk AC144 erst nach dem IFN- α/β -induzierenden Faktor zugegeben wird, (b) aufgrund der hohen Heterogenität der IFN- α/β -induzierenden Faktoren erscheint es äußerst unwahrscheinlich, dass ein einziger Rezeptor für die Induktion der IFN- α/β -Sekretion verantwortlich ist. Die IFN- α/β -Sekretion durch CpG-DNA wird in PDC via TLR9 ausgelöst (Hemmi et al., 2000). Die Induktion der IFN- α/β -Sekretion durch Serum von SLE-Patienten kann dagegen mit Hilfe von CD32 mAk inhibiert werden (Batteux et al., 1999). Da der anti-BDCA-2 mAk AC144 weder TLR9 noch CD32 erkennt, beruht die Inhibition der IFN- α/β -Sekretion in PDC eher auf die Modulation der Signaltransduktion dieser Rezeptoren als auf die Blockierung ihrer Ag-Bindungsdomänen. Die Rolle von BDCA-2 bei der Inhibition der IFN- α/β -Sekretion und die Tatsache, dass BDCA-2 als C-Typ-Lektin potentiell pathogene Zuckerstrukturen erkennen kann, stellen die Gefahr dar, dass bestimmte Krankheitserreger durch die Bindung an BDCA-2 einer gegen sich gerichteten, IFN- α/β -abhängigen Immunantwort entkommen könnten.

IFN- α/β induziert im humanen System genau wie IL-12 p70 Th1-polarisierte Immunantworten (Brinkmann et al., 1993; Hsieh et al., 1993). Während die IFN- α/β -Sekretion das Hauptmerkmal von PDC ist, wurde die Produktion von IL-12 bei PDC lange Zeit diskutiert: (a) Ito et al. berichteten, dass sie kein IL-12 p40 + p70 in den Kulturüberständen nachweisen konnten, wenn sie PDC 24 h mit IL-3, LPS, UV-bestrahlten Sendai-Virus und CpG-DNA kultiviert haben (Ito et al., 2002), (b) Gilliet und Liu berichteten, dass sie kein IL-12 p70 in den Kulturüberständen nachweisen konnten, wenn sie PDC 120 h mit IL-3 und anschließend 6, 12, 24 und 48 h mit CD40L-transfizierten L-Zellen kultiviert haben (Gilliet et al., 2002), (c) Cella et al. berichteten, dass sie IL-12 p70 in den Kulturüberständen nachweisen konnten, wenn sie PDC entweder 40 h mit CD40L-transfizierten Zellen oder LPS kultiviert haben (Cella et al., 1999), (d) Krug et al. berichteten, dass sie IL-12 p70 in den Kulturüberständen nachweisen konnten, wenn sie die PDC 48 h mit CD40L-transfizierten BHK-Zellen und CpG-DNA kultiviert haben, aber nicht, wenn sie die PDC mit CD40L-transfizierten BHK-Zellen oder CpG-DNA allein kultiviert haben (Krug et al., 2001). Krug et al. konnten interessanterweise ebenfalls beobachten, dass eine Vorkultivierungsphase in Gegenwart von IL-3 die Sekretion von IL-12 p70 verstärkt, wogegen die Sekretion von IFN- α/β aus dem gleichen Grund abnimmt. Die Ergebnisse von Krug et al. konnten von uns zum größten Teil reproduziert werden. Im Gegensatz zu Krug und Mitarbeitern konnten wir jedoch zeigen, dass für die IL-12 p70-Sekretion die Ligation von CD40 essenziell ist. CpG-DNA allein induziert keine IL-12 p70-Sekretion, kann allerdings die CD40-abhängige Sekretion verstärken (Dzionek et al., 2002). Eine wichtige und legitime Frage ist, ob das IL-12 tatsächlich von den PDC und nicht von den wenigen (~3%) kontaminierenden Zellen sezerniert wird. In diesem Kontext wurde schon die von Cella et al. gezeigte LPS-induzierte IL-12 p70-Sekretion von PDC auf die Präsenz von kontaminierenden Monozyten zurückgeführt (Shortman et al., 2002). Dieser Behauptung liegt die Tatsache

zu Grunde, dass der LPS-Rezeptor TLR4 von den PDC nicht ausgeprägt wird. Das gleiche Argument spricht im Fall der verstärkten IL-12-Sekretion nach einer Stimulation mit CpG-DNA und CD40L-transfizierten Zellen im Vergleich zu einer Stimulation mit CD40L-transfizierten Zellen allein dafür, dass das IL-12 von den PDC und nicht von den kontaminierenden Zellen sezerniert wird. Durch CpG-DNA können nur Zellen stimuliert werden, die den TLR9 ausprägen. Dieser Rezeptor wird nur von PDC und B-Zellen ausgeprägt, nicht aber von den Monozyten, T-Zellen und NK-Zellen (Hornung et al., 2002). In Anbetracht dessen erscheint es äußerst unwahrscheinlich, dass die wenigen kontaminierenden B-Zellen (nicht detektierbar) die hier nachgewiesene Menge an IL-12 p70 sezernieren konnten.

Die Ligation von BDCA-2 während der Vorkultivierungsphase mit IL-3 verstärkt die IL-12 p70-Sekretion von PDC unabhängig von der Dauer der Vorkultivierungsphase. Die Verstärkung der IL-12 p70-Sekretion ist allerdings kein direkter Effekt der BDCA-2-Ligation, sondern ist auf die Inhibition der IFN- α/β -Sekretion zurückzuführen. Diese Annahme resultiert aus folgender Beobachtung: (a) die Sekretion von IL-12 p70 wird ebenso verstärkt, wenn die PDC in Gegenwart von neutralisierenden anti-IFN- α/β Ak vorkultiviert werden, (b) die Sekretion von IL-12 p70 wird inhibiert, wenn die PDC in Gegenwart von rekombinantem humanem IFN- α/β vorkultiviert werden, (c) die Sekretion von IL-12 p70 wird durch die Zugabe von anti-BDCA-2 mAk AC144 nicht verstärkt, wenn die PDC in Gegenwart von rekombinantem humanem IFN- α/β vorkultiviert werden.

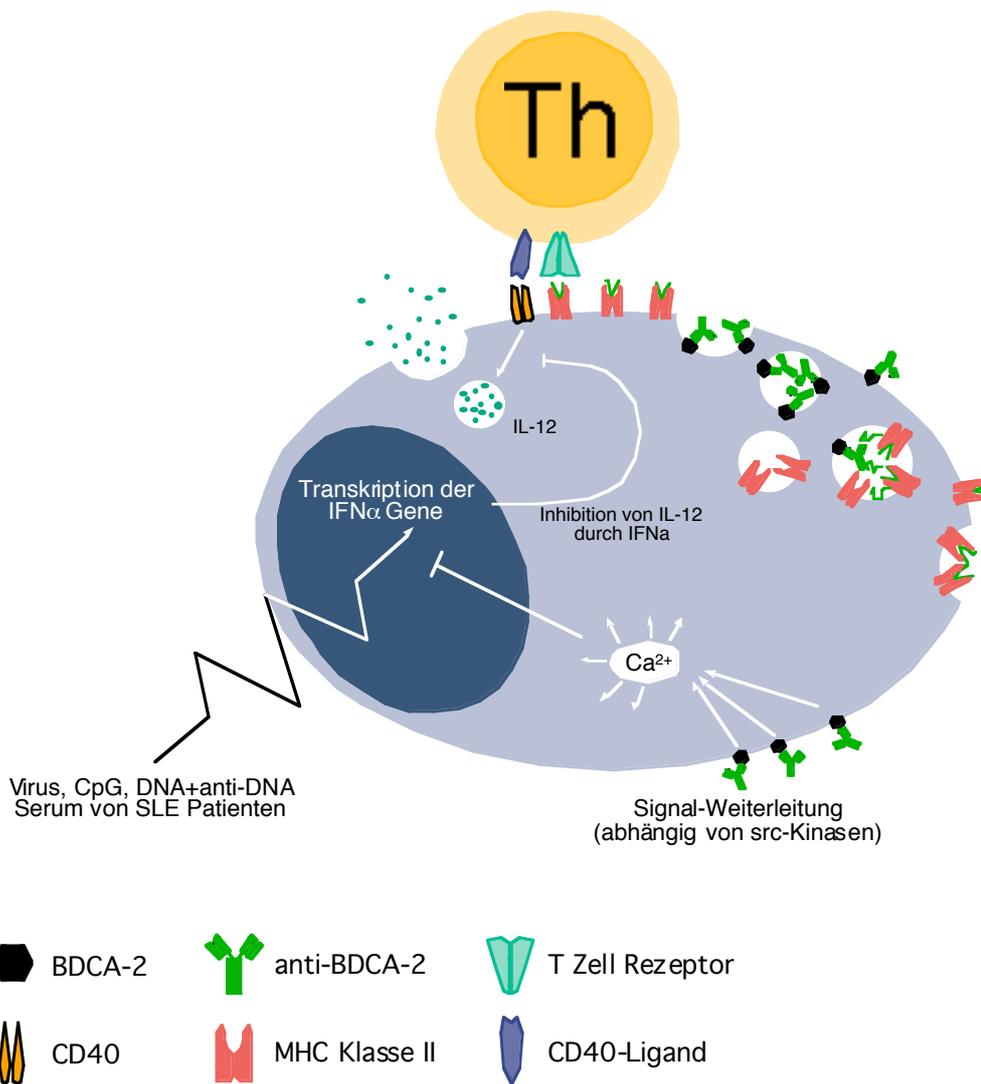


Abbildung 4.1: Funktion von BDCA-2 in der Ag-Präsentation und bei der Regulation der Zytokin-Sekretion. Die über BDCA-2 internalisierten Ag werden in die Prozessierungs- und MHC II Beladungs-Kompartimente transportiert. Nachdem das aufgenommene Ag prozessiert wurde, wird es über MHC II den T-Zellen präsentiert. Weiterhin inhibiert die Ligandierung von BDCA-2 die pathogeninduzierte IFN α -Produktion. Da IFN α die CD40-induzierte Produktion von bioaktivem IL-12 p70 inhibiert, wird die letztgenannte durch die Ligandierung von BDCA-2 verstärkt.

Die inhibierende Wirkung von IFN- α/β auf die IL-12 p70-Sekretion wurde bereits im Falle von murinen Leukozyten (Cousens et al., 1997), humanen mMo-DC (McRae et al., 1998) und Monozyten/Makrophagen (Byrnes et al., 2001) beschrieben. Interessanterweise konnten Dalod et al. vor kurzem mit

Hilfe von IFN- α/β R^{-/-}-Mäusen zeigen, dass das von murinen PDC (CD8 α ⁺ Ly6G/C⁺ CD11b⁻) sezernierte IFN- α/β die IL-12-Produktion von murinen myeloiden DC (CD8 α ⁻ Ly6G/C⁻ CD11b⁺) inhibiert (Dalod et al., 2002). Unsere Ergebnisse zeigen weiter, dass im humanen System die PDC durch Sekretion von IFN- α/β nicht nur die IL-12-Sekretion von anderen Zellen inhibieren können, sondern auch ihre eigene. Weiterhin, bedingt durch den autokrinen Effekt von IFN- α/β , resultiert die Ligation von BDCA-2 auf PDC in einem Profilwechsel der Sekretion von IFN- α/β zu IL-12 p70. Da beide Zytokine im humanen System eine Th1-polarisierte Immunantwort induzieren, könnte die Ligation von BDCA-2 entweder eine Th2-Polarisierung aufgrund der IFN- α/β -Inhibition, oder eine Th1-Polarisierung als Folge der verstärkten IL-12 p70-Sekretion induzieren. Welche der beiden Situationen letztendlich eintritt, hängt davon ab, ob die für die IL-12-Produktion notwendigen Stimuli, insbesondere die CD40-Ligation, gegeben sind. Wie stark die Th-Zell-Polarisation durch PDC dabei von ihrem Reifungs- und Differenzierungsstadium und dadurch auch von den Stimuli, die auf sie einwirken, abhängt, sieht man am Beispiel bisheriger Arbeiten: (a) PDC, die in Gegenwart von IL-3 und CD40L-transfizierten L-Zellen 6 Tage kultiviert werden, induzieren eine IL-4-unabhängige Th2-Polarisation (Rissoan et al., 1999; Dzionek, nicht publizierte Ergebnisse), (b) PDC, die in Gegenwart von IL-3 48 h kultiviert werden, induzieren eine gemischte Th1/Th2-Immunantwort (Mischung aus IL-4⁺, IL-10⁺ und IFN- γ ⁺ T-Zellen; Cella et al., 2000; Dzionek, nicht publizierte Ergebnisse), (c) PDC, die 48 h in Gegenwart von IL-3 kultiviert und dann mit CD40L-transfizierten Zellen oder Influenza-Virus stimuliert werden, induzieren eine IL-12-abhängige (CD40L-transfizierte Zellen) oder eine IFN- α/β -abhängige (Influenza-Virus) Th1-Polarisation (Cella et al., 2000; Dzionek, nicht publizierte Ergebnisse), (d) PDC, die in Gegenwart von Herpes-Simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) kultiviert werden, induzieren eine IFN- α/β -abhängige Th1-Polarisation (Kadowaki et al., 2000) und (e) PDC, die 60 h in Gegenwart

von IL-3 kultiviert und dann 6 h mit CD40L-transfizierten Zellen und CpG-DNA stimuliert werden, induzieren eine IL-12-abhängige Th1-Polarisation (Krug et al., 2001).

Bei Bedingungen, unter denen die PDC eine gemischte Th1/Th2-Immunantwort induzieren, bewirkt die Ligation von BDCA-2 nur eine schwache Verschiebung der Th-Polarisation in Richtung Th2. Dieser Effekt ist deswegen schwach ausgeprägt, weil die reduzierte Sekretion von IFN- α/β durch die verstärkte Produktion von IL-12 p70 funktionell kompensiert wird. Dies ist ersichtlich aus der Tatsache, dass die Verschiebung der Th-Polarisation in Richtung Th2 nach der BDCA-2-Ligation viel deutlicher ausfällt, wenn das IL-12 p70 gleichzeitig mit Hilfe von blockierenden anti-IL-12 p70 mAk neutralisiert wird. Interessanterweise werden nach der Ligation von BDCA-2 weniger T-Zellen detektiert, die sowohl IL-10 als auch IFN- γ produzieren (IL-10/IFN- γ -Doppelproduzenten). In diesem Fall hat die Blockierung von IL-12 p70 keinen Einfluss auf diesen Effekt. Demzufolge ist IL-12 weniger effizient in der Induktion von IL-10/IFN- γ -Doppelproduzenten und kann daher die Funktion von IFN- α/β in diesem Beispiel nicht kompensieren.

Die Auswirkung der Ligation von BDCA-2 auf die Th-Polarisation *in vivo* bleibt vorerst spekulativ. Ungleich IFN- α/β , benötigt die Produktion von IL-12 p70 in PDC ein Signal, das durch die Interaktion zwischen CD40 und CD40L vermittelt wird. Aus diesem Grund ist es wahrscheinlicher, dass die IL-12-Produktion in der Nähe von frisch aktivierten T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen erfolgt, wogegen die Produktion von IFN- α/β während der initialen Phase der Aktivierung am Ort der Infektion stattfindet. Die Ligation von BDCA-2 könnte daher zur verstärkten Sekretion von IL-12 p70 in den sekundären lymphatischen Organen und dadurch eher zu einer Verschiebung der Th-Polarisation in Richtung Th1 als Th2 führen.

4.7 Die Relevanz von BDCA-2 in SLE

In SLE-Patienten findet man in der Zirkulation eine erhöhte Konzentration an IFN- α/β , die in einen engen Zusammenhang mit der Pathogenese von SLE gebracht wird (Strannegard et al., 1982; Kim et al., 1987; Ytterberg et al., 1982). Diese Annahme wird stark durch die Beobachtung gestützt, dass die IFN- α/β -Behandlung von Patienten mit nicht autoimmunologischen Erkrankungen die Produktion von autoreaktiven anti-dsDNA Ak und die Entwicklung des sogenannten SLE-ähnlichen Syndroms induziert (Kalkner et al., 1998; Ronnblom et al., 1990; Ronnblom et al., 1991; Ehrenstein et al., 1993). Es konnte ebenso gezeigt werden, dass die Hauptproduzenten von IFN- α/β bei dieser Erkrankung die PDC sind. Im Widerspruch dazu hat sich herausgestellt, dass die SLE-Patienten, verglichen mit gesunden Spendern, nur sehr niedrige Frequenzen an PDC im peripherem Blut aufweisen (Cederblad et al., 1998). Dies bedeutet, dass entweder die PDC von den SLE-Patienten in der Lage sind, viel mehr IFN- α/β als die PDC von gesunden Spendern zu produzieren, oder dass das meiste IFN- α/β nicht im Blut, sondern in anderen Geweben sezerniert wird. Farkas und Blomberg zeigten vor kurzem, dass bei den SLE-Patienten die PDC besonders stark in den Haut-Läsionen akkumulieren (Farkas et al., 2001; Blomberg et al., 2001) und gleichzeitig die Anzahl an Zellen, die das IFN- α/β -induzierbare Protein MxA ausdrücken, stark mit der Frequenz von PDC in diesen Läsionen korreliert (Farkas et al., 2001). Demnach könnte die niedrige Frequenz von PDC im Blut von SLE-Patienten auf ihre Migration in das entzündete Gewebe zurückzuführen sein, wo anschließend das meiste IFN- α/β sezerniert wird.

Basierend auf unseren *in vitro*-Ergebnissen erscheint es denkbar, eine Therapie zu entwickeln, bei der die IFN- α/β -Sekretion mit Hilfe von anti-BDCA-2 mAk inhibiert wird. In diesem Zusammenhang wurde bereits spekuliert, dass diese Art von Therapie die angeborene Immunität gegen virale Infektionen beeinträchtigen und die Produktion von autoreaktiven Ak durch die

Verschiebung der Th-Polarisation in Richtung von Th2 begünstigen könnte (Ronnlom et al., 2001). Unsere *in vitro*-Ergebnisse zeigen allerdings, dass die Th-Polarisation durch die Ligation von BDCA-2 nur unwesentlich beeinflusst wird. Außerdem gibt es viele Anzeichen dafür, dass die IFN- α/β - und die IL-12 p70-Produktion von PDC räumlich und auch zeitlich voneinander getrennt ist und dass die BDCA-2-Ligation eher eine Th1- als eine Th2-Polarisation induzieren kann (Kapitel 4.6). Ob die Funktion von IFN- α/β bei der Bekämpfung viraler Infekte durch IL-12 kompensiert werden kann, muß in weiteren Untersuchungen gezeigt werden.

4.8 Ausblick

Obwohl die Funktion von BDCA-2 weitgehend aufgeklärt werden konnte, bleiben weiterhin einige Fragen offen. Eine der wichtigsten ist die Frage nach dem natürlichen Liganden von BDCA-2. Erste Versuche mit rekombinantem, löslichen BDCA-2 deuten daraufhin, dass der Ligand von B-Zellen und einer Population von CD16⁺ Monozyten ausgeprägt wird (Gregor Winkels, nicht publizierte Ergebnisse). Da das in diesen Experimenten verwendete BDCA-2 in Bakterien produziert wurde, könnte die fehlende Glykosylierung des Moleküls allerdings zu falschen Ergebnissen geführt haben. Aus diesem Grund ist es notwendig, diese Versuche mit BDCA-2 zu wiederholen, das im eukaryontischen System produziert wurde. Für die genaue Identifizierung des bzw. der Liganden werden in der nächsten Zukunft zwei Techniken parallel angewandt werden. Mit Hilfe des rekombinanten BDCA-2 kann ein Ligand aus Zellen, an die das Protein spezifisch bindet, direkt präzipitiert werden. Weiterhin wird mit der mRNA aus den gleichen Zellen eine cDNA-Bibliothek hergestellt und für die Ausprägungsklonierung verwendet. Die positiven Klone können dabei ebenso mit dem rekombinanten BDCA-2 detektiert werden.

Desweiteren bleiben die Mechanismen der BDCA-2-vermittelten Internalisation und Signalweiterleitung ungeklärt. Da es einige Hinweise dafür gibt (Kapitel 4.5), dass assoziierte Moleküle hier eine wichtige Rolle spielen könnten, ist

geplant, mit Hilfe von anti-BDCA-2 mAk zuerst eine Koimmunopräzipitation durchzuführen. Als Proteinquelle werden dabei BDCA-2-transfizierte Zellen verwendet, die jeweils im Hinblick auf Internalisation bzw. Signalweiterleitung funktionell sind.

Die funktionellen Eigenschaften von BDCA-2 eröffnen zusätzlich eine Reihe von Möglichkeiten für den therapeutischen Einsatz von anti-BDCA-2 mAk. Die blockierende Wirkung des anti-BDCA-2 mAk im Hinblick auf die IFN- α/β -Produktion macht es attraktiv für den Einsatz bei Erkrankungen, bei denen IFN- α/β eine pathophysiologische Rolle spielt. Hier ist bereits eine klinische Studie geplant, wo Patienten mit einer SLE-Erkrankung anti-BDCA-2 mAk intravenös verabreicht bekommen. Ebenso vorstellbar wäre der Einsatz von anti-BDCA-2 mAk als Vehikel, um Ag in PDC einzuschleusen, was eine Verstärkung der Ag-Präsentation zur Folge haben könnte. Ein solches Konjugat, bestehend aus dem anti-BDCA-2 mAk und dem jeweiligem Ag, könnte den Patienten zum Beispiel bei der Krebsbehandlung direkt injiziert werden, ohne dass die PDC für die Ag-Beladung isoliert werden müssten.

5 Zusammenfassung

DC sind APC, deren Hauptfunktion in der Antigenaufnahme und Induktion T-Zell-abhängiger Immunantworten besteht. In den letzten Jahren wurden viele neue Subpopulationen von DC beschrieben, was die hohe Heterogenität dieser Population deutlich macht. Die einzelnen Subpopulationen unterscheiden sich nicht nur in ihrem Phänotyp, sondern auch in ihrer Morphologie, Funktion und Gewebeverteilung. Die charakteristische Funktion einzelner Subpopulationen wird größtenteils durch die Oberflächenrezeptoren bestimmt, über die die Zellen mit ihrer Umgebung in Verbindung stehen. Um die Rolle der DC innerhalb des Immunsystems und die funktionellen Unterschiede zwischen den einzelnen DC-Subpopulationen besser verstehen zu können, ist es daher notwendig, diese Moleküle genau zu erforschen.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der kontralateralen Immunisierung eine Reihe von monoklonalen Antikörpern generiert, die drei BDC-spezifische Oberflächenantigene erkennen: BDCA-2, BDCA-3 und BDCA-4. BDCA-3 wird von CD11c⁺ CD123⁻ myeloiden BDC ausgeprägt und ist identisch mit Thrombomodulin, einem Rezeptor des vaskulären Endothels, der mit Thrombin 1:1 Komplexe bilden kann und somit die Funktion eines natürlichen Antikoagulans besitzt. BDCA-2 und BDCA-4 werden im Gegensatz zu BDCA-3 von CD11c⁻ CD123⁺⁺ PDC ausgeprägt. Bei BDCA-4 handelt es sich um Neuropilin-1, einen neuronalen Rezeptor, der bei der Ausbildung von Axonen eine wichtige Rolle spielt. Zusätzlich wird Neuropilin-1 neben den PDC auch von endothelialen und Tumor-Zellen als Rezeptor für den vaskulären, endothelialen Wachstumsfaktor-A (VEGF-A) ausgeprägt und spielt eine Schlüsselrolle in der Angiogenese. Weiterhin wird die Ausprägung von BDCA-4 auf CD11c⁺ BDC, Monozyten und T-Zellen durch Stimulation bzw. *in vitro*-Kultivierung induziert. Die Funktion von BDCA-3 und BDCA-4 im Fall der BDC ist allerdings noch nicht bekannt.

Ausprägungsklonierung von BDCA-2 ergab, dass es sich bei diesem Molekül um ein neues Typ II c-Typ-Lektin handelt, das eine 50,7%-ige Übereinstimmung der AS-Sequenz mit seinem murinen Ortholog, Dectin-2, aufweist. Das Ausprägungsmuster von BDCA-2 ist in allen bisher untersuchten Geweben ausschließlich auf die CD11c⁻ CD123⁺⁺ PDC beschränkt. Die Tatsache, dass anti-BDCA-2 mAk nach ihrer Bindung an BDCA-2 sofort internalisiert, prozessiert und über MHC Klasse II-Moleküle präsentiert werden, deutet daraufhin, dass BDCA-2 bei der Antigenaufnahme und -präsentation eine Rolle spielen könnte. Weiterhin induziert die Ligation von BDCA-2 mit dem spezifischen mAk AC144 eine nahezu vollständige Inhibition der Sekretion von IFN- α/β . Da IFN- α/β die Produktion von IL-12 inhibiert, verstärkt die Ligation von BDCA-2 gleichzeitig die CD40L-abhängige IL-12-Sekretion bei PDC. Aus diesem Grund wird durch die Ligation von BDCA-2 weniger die Polarisation der PDC-induzierten T-Zell-Antwort beeinflusst, sondern vielmehr ein Wechsel von IFN- α/β -kontrollierten zu IL-12-

kontrollierten Immunität induziert. Da IFN- α/β und IL-12 sehr vielfältige und zum Teil ähnliche Funktionen ausüben, sind die *in vivo*-Folgen einer BDCA-2-Ligation nur sehr schwierig vorherzusagen. Gleichwohl macht die Tatsache, dass IFN- α/β eine wichtige Rolle bei einer Reihe von autoimmunologischen Erkrankungen spielt, BDCA-2 sehr interessant als Ziel zukünftiger Therapien.

6 Literaturverzeichnis

- Adema G. J.**, Hartgers F., Verstraten R., de Vries E., Marland G., Menon S., Foster J., Xu Y., Nooyen P., McClanahan T., Bacon K. B. und Figdor C. G. 1997. A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature* 387:713
- Akira S.**, Takeda K. und Kaisho T. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2:675
- Ariizumi K.**, Shen G. L., Shikano S., Ritter R. 3rd, Zukas P., Edelbaum D., Morita A. und Takashima A. 2000. Cloning of a second dendritic cell-associated C-type lectin (dectin-2) and its alternatively spliced isoforms. *J. Biol. Chem.* 275:11957
- Bauer M.**, Redecke V., Ellwart J. W., Scherer B., Kremer J. P., Wagner H. und Lipford G. B. 2001. Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells. *J. Immunol.* 166:5000
- Bates E. E.**, Fournier N., Garcia E., Valladeau J., Durand I., Pin J. J., Zurawski S. M., Patel S., Abrams J. S., Lebecque S., Garrone P. und Saeland S. 1999. APCs express DCIR, a novel C-type lectin surface receptor containing an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *J. Immunol.* 163:1973
- Batteux F.**, Palmer P., Daeron M., Weill B. und Lebon P. 1999. FCgammaRII (CD32)-dependent induction of interferon-alpha by serum from patients with lupus erythematosus. *Eur. Cytokine. Netw.* 10:509
- Bieber T.** 1992. Fc epsilon RII/CD23 on epidermal Langerhans' cells. *Res. Immunol.* 143:445
- Blom B.**, Ho S., Antonenko S. und Liu Y. J. 2000. Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 192:1785
- Blomberg S.**, Eloranta M. L., Cederblad B., Nordlin K., Alm G. V. und Ronnblom L. 2001. Presence of cutaneous interferon-alpha producing cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 10:484
- Bowen M. B.**, Butch A. W., Parvin C. A., Levine A. und Nahm M. H. 1991. Germinal center T cells are distinct helper-inducer T cells. *Hum. Immunol.* 31:67
- Bradley L. M.** und Watson S. R. 1996. Lymphocyte migration into tissue: the paradigm derived from CD4 subsets. *Curr. Opin. Immunol.* 8:312
- Breitfeld D.**, Ohl L., Kremmer E., Ellwart J., Sallusto F., Lipp M. und Forster R. 2000. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J. Exp. Med.* 192:1545
- Brinkmann V.**, Geiger T., Alkan S. und Heusser C. H. 1993. Interferon alpha increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 178:1655
- Brown M. G.**, Driscoll J. und Monaco J. J. 1993. MHC-linked low-molecular mass polypeptide subunits define distinct subsets of proteasomes.

- Implications for divergent function among distinct proteasome subsets. *J. Immunol.* 151:1193
- Butcher E. C.** und **Picker L. J.** 1996. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272:60
- Byrnes A. A.**, **Ma X.**, **Cuomo P.**, **Park K.**, **Wahl L.**, **Wolf S. F.**, **Zhou H.**, **Trinchieri G.** und **Karp C. L.** 2001. Type I interferons and IL-12: convergence and cross-regulation among mediators of cellular immunity. *Eur. J. Immunol.* 31:2026
- Carbone F.R.**, **Hosken N. A.**, **Moore M. W.** und **Bevan M. J.** 1989. Class I MHC-restricted cytotoxic responses to soluble protein antigen. *Cold. Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 54 Pt 1:551
- Cataldi A.**, **Santavenere E.**, **Vitale M.**, **Trubiani O.**, **Lisio R.**, **Tulipano G.**, **Di Domenicantonio L.**, **Zamai L.** und **Miscia S.** 1992. Interferon affects cell growth progression by modulating DNA polymerases activity. *Cell. Prolif.* 25:225
- Caux C.**, **Dezutter-Dambuyant C.**, **Schmitt D.** und **Banchereau J.** 1992. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360:258
- Cederblad B.**, **Blomberg S.**, **Vallin H.**, **Perers A.**, **Alm G. V.** und **Ronnblom L.** 1998. Patients with systemic lupus erythematosus have reduced numbers of circulating natural interferon-alpha- producing cells. *J. Autoimmun.* 11:465
- Cella M.**, **Scheidegger D.**, **Palmer-Lehmann K.**, **Lane P.**, **Lanzavecchia A.** und **Alber G.** 1996. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.* 184:747
- Cella M.**, **Engering A.**, **Pinet V.**, **Pieters J.** und **Lanzavecchia A.** 1997. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388:782
- Cella M.**, **Sallusto F.** und **Lanzavecchia A.** 1997. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 9:10
- Cella M.**, **Jarrossay D.**, **Facchetti F.**, **Alebardi O.**, **Nakajima H.**, **Lanzavecchia A.** und **Colonna M.** 1999. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat. Med.* 5:919
- Cella M.**, **Salio M.**, **Sakakibara Y.**, **Langen H.**, **Julkunen I.** und **Lanzavecchia A.** 1999. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J. Exp. Med.* 189:821
- Cella M.**, **Facchetti F.**, **Lanzavecchia A.** und **Colonna M.** 2000. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat. Immunol.* 1:305
- Cousens L. P.**, **Orange J. S.**, **Su H. C.** und **Biron C. A.** 1997. Interferon-alpha/beta inhibition of interleukin 12 and interferon-gamma production in vitro and endogenously during viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94:634

- Crawford K.**, Gabuzda D., Pantazopoulos V., Xu J., Clement C., Reinherz E. und Alper C. A. 1999. Circulating CD2+ monocytes are dendritic cells. *J. Immunol.* 163:5920
- Dalod M.**, Salazar-Mather T. P., Malmgaard L., Lewis C, Asselin-Paturel C., Briere F., Trinchieri G. und Biron C. A. 2002. Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *J. Exp. Med.* 195:517
- Dzionic A.**, Fuchs A., Schmidt P., Cremer S., Zysk M., Miltenyi S., Buck D. W. und Schmitz J. 2000. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 165:6037
- Dzionic A.**, Sohma Y., Nagafune J., Cella M., Colonna M., Facchetti F., Gunther G., Johnston I., Lanzavecchia A., Nagasaka T., Okada T, Vermi W., Winkels G., Yamamoto T., Zysk M., Yamaguchi Y. und Schmitz J. 2001. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J. Exp. Med.* 194:1823
- Dzionic A.**, Inagaki Y., Okawa K., Nagafune J., Rock J., Sohma Y., Winkels G., Zysk M., Yamaguchi Y. und Schmitz J. 2002. Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum. Immunol.* 63:1133
- Ehrenstein M. R.**, McSweeney E., Swane M., Worman C. P., Goldstone A. H. und Isenberg D. A. 1993. Appearance of anti-DNA antibodies in patients treated with interferon-alpha. *Arthritis. Rheum.* 36:279
- Ehrenstein M. R.**, Longhurst C. und Isenberg D. A. 1993. Production and analysis of IgG monoclonal anti-DNA antibodies from systemic lupus erythematosus (SLE) patients. *Clin. Exp. Immunol.* 92:39
- Engering A.**, Geijtenbeek T. B., van Vliet S. J., Wijers M., van Liempt E., Demaurex N., Lanzavecchia A., Fransen J., Figdor C. G., Piguet V. und van Kooyk Y. 2002. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J. Immunol.* 168:2118
- Esmon N. L.** 1987. Thrombomodulin. *Semin. Thromb. Hemost.* 13:454
- Esmon C. T.** 1987. The regulation of natural anticoagulant pathways. *Science* 235:1348
- Facchetti F.**, de Wolf-Peeters C., Mason D. Y., Pulford K., van den Oord J. J. und Desmet V. J. 1988. Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin. *Am. J. Pathol.* 133:15
- Fanger N. A.**, Wardwell K., Shen L., Tedder T. F. und Guyre P. M. 1996. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J. Immunol.* 157:541
- Farkas L.**, Beiske K., Lund-Johansen F., Brandtzaeg P. und Jahnsen F. L. 2001. Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *Am. J. Pathol.* 159:237

- Feinberg H.**, Mitchell D. A., Drickamer K. und Weis W. I. 2001. Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science* 294:2163
- Feldman S. B.**, Ferraro M., Zheng H. M., Patel N., Gould-Fogerite S. und Fitzgerald-Bocarsly P. 1994. Viral induction of low frequency interferon-alpha producing cells. *Virology* 204:1
- Fernandes M. J.**, Finnegan A. A., Siracusa L. D., Brenner C., Iscove N. N. und Calabretta B. 1999. Characterization of a novel receptor that maps near the natural killer gene complex: demonstration of carbohydrate binding and expression in hematopoietic cells. *Cancer. Res.* 59:2709
- Figdor C. G.**, van Kooyk Y. und Adema G. J. 2002. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2:77
- Fitzgerald-Bocarsly P.** 1993. Human natural interferon-alpha producing cells. *Pharmacol. Ther.* 60:39
- Fraser C. C.**, Scharp J. D., Wrighton N., Myers P.S. und Goodearl A. D. J. 2001. Novel gens encoding proteins having prognostic, diagnostic, preventive, therapeutic, and other uses: In: WO 01/18016 A1, international patent application published under the patent cooperation treaty (PCT). United States: Millenium Pharmaceuticals.
- Fulcher C. A.**, Gardiner J. E., Griffin J. H. und Zimmerman T. S. 1984. Proteolytic inactivation of human factor VIII procoagulant protein by activated human protein C and its analogy with factor V. *Blood* 63:486
- Geijtenbeek T. B.**, Torensma R., van Vliet S. J., van Duijnhoven G. C., Adema G. J., van Kooyk Y. und Figdor C. G. 2000. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100:575
- Geijtenbeek T. B.**, Krooshoop D. J., Bleijs D. A., van Vliet S. J., van Duijnhoven G. C., Grabovsky V., Alon R., Figdor C. G. und van Kooyk Y. 2000. DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat. Immunol.* 1:353
- Geijtenbeek T. B.**, van Duijnhoven G. C., van Vliet S. J., Krieger E., Vriend G., Figdor C. G. und van Kooyk Y. 2002. Identification of different binding sites in the dendritic cell-specific receptor DC-SIGN for intercellular adhesion molecule 3 and HIV-1. *J. Biol. Chem.* 277:11314
- Germain R. N.** 1994. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76:287
- Gilliet M.** und Liu Y. J. 2002. Human plasmacytoid-derived dendritic cells and the induction of T-regulatory cells. *Hum. Immunol.* 63:1149
- Gilliet M.** und Liu Y. J. 2002. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 195:695
- Gobl A. E.**, Funa K. und Alm G. V. 1988. Different induction patterns of mRNA for IFN-alpha and -beta in human mononuclear leukocytes after in vitro stimulation with herpes simplex virus-infected fibroblasts and Sendai virus. *J. Immunol.* 140:3605

- Grouard G.**, Durand I., Filgueira L., Banchereau J. und Liu Y. J. 1996. Dendritic cells capable of stimulating T cells in germinal centres. *Nature* 384:364
- Grouard G.**, Rissoan M. C., Filgueira L., Durand I., Banchereau J. und Liu Y. J. 1997. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J. Exp. Med.* 185:1101
- He Z.** und Tessier-Lavigne M. 1997. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 90:739
- Hemmi H.**, Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K. und Akira S. 2001. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408:740
- Hornung V.**, Rothenfusser S., Britsch S., Krug A., Jahrsdorfer B., Giese T., Endres S. und Hartmann G. 2002. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* 168:4531
- Hsieh C. S.**, Macatonia S. E., Tripp C. S., Wolf S. F., O'Garra A. und Murphy K. M. 1993. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260:547
- Inaba K.**, Inaba M., Naito M. und Steinman R. M. 1993. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J. Exp. Med.* 178:479
- Ioannou Y.** und Isenberg D. A. 2000. Current evidence for the induction of autoimmune rheumatic manifestations by cytokine therapy. *Arthritis. Rheum.* 43:1431
- Ito T.**, Inaba M., Inaba K., Toki J., Sogo S., Iguchi T., Adachi Y., Yamaguchi K., Amakawa R., Valladeau J., Saeland S., Fukuhara S. und Ikehara S. 1999. A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. *J. Immunol.* 163:1409
- Ito T.**, Amakawa R., Kaisho T., Hemmi H., Tajima K., Uehira K., Ozaki Y., Tomizawa H., Akira S. und Fukuhara S. 2002. Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J. Exp. Med.* 195:1507
- Jacob J.** und Kelsoe G. 1992. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. II. A common clonal origin for periarteriolar lymphoid sheath-associated foci and germinal centers. *J. Exp. Med.* 176:679
- Jahnsen F. L.**, Lund-Johansen F., Dunne J. F., Farkas L., Haye R. und Brandtzaeg P. 2000. Experimentally induced recruitment of plasmacytoid (CD123high) dendritic cells in human nasal allergy. *J. Immunol.* 165:4062
- Jiang W.**, Swiggard W. J., Heufler C., Peng M., Mirza A., Steinman R. M. und Nussenzweig M. C. 1995. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375:151

- Josien R.**, Wong B. R., Li H. L., Steinman R. M. und Choi Y. 1999. TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells. *J. Immunol.* 162:2562
- Kadowaki N.**, Antonenko S., Lau J. Y. und Liu Y. J. 2000. Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J. Exp. Med.* 192:219
- Kadowaki N.**, Antonenko S., Ho S., Rissoan M. C., Soumelis V., Porcelli S. A., Lanier L. L. und Liu Y. J. 2001. Distinct cytokine profiles of neonatal natural killer T cells after expansion with subsets of dendritic cells. *J. Exp. Med.* 193:1221
- Kadowaki N.**, Ho S., Antonenko S., Malefyt R. W., Kastelein R. A., Bazan F. und Liu Y. J. 2001. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* 194:863
- Kadowaki N.**, Antonenko S. und Liu Y. J. 2001. Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c- type 2 dendritic cell precursors and CD11c+ dendritic cells to produce type I IFN. *J. Immunol.* 166:229
- Kalkner K. M.**, Ronnblom L., Karlsson Parra A. K., Bengtsson M., Olsson Y. und Oberg K. 1998. Antibodies against double-stranded DNA and development of polymyositis during treatment with interferon. *QJM* 91:393
- Kato M.**, Neil T. K., Fearnley D. B., McLellan A. D., Vuckovic S. und Hart D. N. 2000. Expression of multilectin receptors and comparative FITC-dextran uptake by human dendritic cells. *Int. Immunol.* 12:1511
- Kearney E. R.**, Pape K. A., Loh D. Y. und Jenkins M. K. 1994. Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. *Immunity* 1:327
- Kim T.**, Kanayama Y., Negoro N., Okamura M., Takeda T. und Inoue T. 1987. Serum levels of interferons in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 70:562
- Koch F.**, Stanzl U., Jennewein P, Janke K., Heufler C., Kampgen E., Romani N. und 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
- Kohrgruber N.**, Halanek N., Groger M., Winter D., Rappersberger K., Schmitt-Egenolf M., Stingl G. und Maurer D. 1999. Survival, maturation, and function of CD11c- and CD11c+ peripheral blood dendritic cells are differentially regulated by cytokines. *J. Immunol.* 163:3250
- Koide S. L.**, Inaba K. und Steinman R. M. 1987. Interleukin 1 enhances T-dependent immune responses by amplifying the function of dendritic cells. *J. Exp. Med.* 165:515
- Kolenik S.**, Ding T. G. und Longley J. 1990. Granulocyte macrophage--colony-stimulating factor (GM-CSF) decreases CD1a expression by human

Langerhans cells and increases proliferation in the mixed epidermal cell-lymphocyte reaction (MELR). *J. Invest. Dermatol.* 95:359

Kolodkin A. L., Levengood D. V., Rowe E. G., Tai Y. T., Giger R. J. und Ginty D. D. 1997. Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 90:753

Krug A., Towarowski A., Britsch S., Rothenfusser S., Hornung V., Bals R., Giese T., Engelmann H., Endres S., Krieg A. M. und Hartmann G. 2001. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur. J. Immunol.* 31:3026

Krug A., Rothenfusser S., Hornung V., Jahrsdorfer B., Blackwell S., Ballas Z. K., Endres S., Krieg A. M. und Hartmann G. 2001. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 31:2154

Lennert K., Kaiserling E. und Muller-Hermelink H. K. 1975. Letter: T-associated plasma-cells. *Lancet* 1:103

Liang P., Bauer D., Averboukh L., Warthoe P., Rohrwild M., Muller H., Strauss M. und Pardee A. B. 1995. Analysis of altered gene expression by differential display. *Methods. Enzymol.* 254:304

Liu Y. J. und Blom B. 2000. Introduction: TH2-inducing DC2 for immunotherapy. *Blood* 95:2482

Liu Y. J., Kadowaki N., Rissoan M. C. und Soumelis V. 2000. T cell activation and polarization by DC1 and DC2. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 251:149

Liu Y. J. 2001. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 106:259

Liu Y. J., Kanzler H., Soumelis V. und Gilliet M. 2001. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat. Immunol.* 2:585

Mahnke K., Guo M., Lee S., Sepulveda H., Swain S. L., Nussenzweig M. und Steinman R. M. 2000. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J. Cell. Biol.* 151:673

Matthew W. D. und Sandrock A. W. Jr. 1987. Cyclophosphamide treatment used to manipulate the immune response for the production of monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods.* 100:73

Maurer D., Fiebiger S., Ebner C., Reininger B., Fischer G. F., Wichlas S., Jouvin M. H., Schmitt-Egenolf M., Kraft D., Kinet J. P. und Stingl G. 1996. Peripheral blood dendritic cells express Fc epsilon RI as a complex composed of Fc epsilon RI alpha- and Fc epsilon RI gamma-chains and can use this receptor for IgE-mediated allergen presentation. *J. Immunol.* 157:607

McRae B. L., Semnani R. T., Hayes M. P. und van Severter G. A. 1998 Type I IFNs inhibit human dendritic cell IL-12 production and Th1 cell development. *J. Immunol.* 160:4298

Mitchell D. A., Fadden A. J. und Drickamer K. 2001. A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR.

Subunit organization and binding to multivalent ligands. *J. Biol. Chem.* 276:28939

Moll H., Fuchs H., Blank C. und 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.* 23:159

Nijman H. W., Kleijmeer M. J., Ossevoort M. A., Oorschot V. M., Vierboom M. P., van de Keur M., Kenemans P., Kast W. M., Geuze H. J. und Melief C. J. 1995. Antigen capture and major histocompatibility class II compartments of freshly isolated and cultured human blood dendritic cells. *J. Exp. Med.* 182:163

O'Doherty U., Swiggard W. J., Inaba K., Yamaguchi Y., Kopeloff I., Bhardwaj N. und Steinman R. M. 1993. Tolerizing mice to human leukocytes: a step toward the production of monoclonal antibodies specific for human dendritic cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 329:165

O'Doherty U., Steinman R. M., Peng M., Cameron P. U., Gezelter S., Kopeloff I., Swiggard W. J., Pope M. und Bhardwaj N. 1993. Dendritic cells freshly isolated from human blood express CD4 and mature into typical immunostimulatory dendritic cells after culture in monocyte-conditioned medium. *J. Exp. Med.* 178:1067

O'Doherty U., Peng M., Gezelter S., Swiggard W. J., Betjes M., Bhardwaj N. und Steinman R. M. 1994. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 82:487

Ohashi H., Maruyama K., Liu Y. C. und Yoshimura A. 1994. Ligand-induced activation of chimeric receptors between the erythropoietin receptor and receptor tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91:158

Olweus J., BitMansour A., Warnke R., Thompson P. A., Carballido J., Picker L. J. und Lund-Johansen F. 1997. Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94:12551

Padgett R. A., Grabowski P. J., Konarska M. M., Seiler S. und Sharp P. A. 1986. Splicing of messenger RNA precursors. *Annu. Rev. Biochem.* 55:1119

Perussia B., Fanning V. und Trinchieri G. 1985. A leukocyte subset bearing HLA-DR antigens is responsible for in vitro alpha interferon production in response to viruses. *Nat. Immun. Cell. Growth. Regul.* 4:120

Picker L. J. und Butcher E. C. 1992. Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu. Rev. Immunol.* 10:561

Pickl W. F., Majdic O., Kohl P., Stockl J., Riedl E., Scheinecker C., Bello-Fernandez C. und Knapp W. 1996. Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14+ peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* 157:3850

Pierre P., Turley S. J., Meltzer J., Mirza A., Steinman R. und Mellman I. 1997. Localization and intracellular transport of MHC class II molecules in bone marrow-derived dendritic cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 417:179

- Pure E.**, Inaba K., Crowley M. T., Tardelli L., Witmer-Pack M. D., Ruberti G, Fathman G. und Steinman R. M. 1990. Antigen processing by epidermal Langerhans cells correlates with the level of biosynthesis of major histocompatibility complex class II molecules and expression of invariant chain. *J. Exp. Med.* 172:1459
- Reis e Sousa C.**, Stahl P. D. und Austyn J. M. 1993. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J. Exp. Med.* 178:509
- Ridderstad A.** und Tarlinton D. M. 1998. Kinetics of establishing the memory B cell population as revealed by CD38 expression. *J. Immunol.* 160:4688
- Rissoan M. C.**, Soumelis V., Kadowaki N., Grouard G., Briere F., de Waal Malefyt R. und Liu Y. J. 1999. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283:1183
- Robinson S. P.**, Patterson S., English N., Davies D., Knight S. C. und Reid C. D. 1999. Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 29:2769
- Romani N.** und G. Schuler. 1989. Structural and functional relationships between epidermal Langerhans cells and dendritic cells. *Res. Immunol.* 140:895
- Romani N.**, Gruner S., Brang D., Kampgen E., Lenz A., Trockenbacher B., Konwalinka G., Fritsch P. O., Steinman R. M. und Schuler G. 1994. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* 180:83
- Ronnblom L. E.**, Alm G. V. und Oberg K. E. 1990. Possible induction of systemic lupus erythematosus by interferon-alpha treatment in a patient with a malignant carcinoid tumour. *J. Intern. Med.* 227:207
- Ronnblom L. E.**, Alm G. V. und Oberg K. E. 1991. Autoimmunity after alpha-interferon therapy for malignant carcinoid tumors. *Ann. Intern. Med.* 115:178
- Ronnblom L. E.**, Alm G. V. und Oberg K. 1991. Autoimmune phenomena in patients with malignant carcinoid tumors during interferon-alpha treatment. *Acta. Oncol.* 30:537
- Ronnblom L.** und Alm G. V. 2001. A pivotal role for the natural interferon alpha-producing cells (plasmacytoid dendritic cells) in the pathogenesis of lupus. *J. Exp. Med.* 194:F59
- Sallusto F.** und Lanzavecchia A. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 179:1109
- Sallusto F.**, Cella M., Danieli C. und Lanzavecchia A. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182:38
- Sallusto F.**, Schaerli P., Loetscher P., Schaniel C., Lenig D., Mackay C. R., Qin S. und Lanzavecchia A. 1998. Rapid and coordinated switch in chemokine

receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* 28:2760

Shortman K. und Liu Y. J. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* 2:151

Siegal F. P., Kadowaki N., Shodell M., Fitzgerald-Bocarsly P. A., Shah K., Ho S., Antonenko S. und Liu Y. J. 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284:1835

Soker S., Takashima S., Miao H. Q., Neufeld G. und Klagsbrun M. 1998. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92:735

Soker S., Miao H. Q., Nomi M., Takashima S. und Klagsbrun M. 2002. VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *J. Cell. Biochem.* 85:357

Spits H., Couwenberg F., Bakker A. Q., Weijer K. und Uittenbogaart C. H. 2000. Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2. *J. Exp. Med.* 192:1775

Stossel H., Koch F., Kampgen E., Stoger P., Lenz A., Heufler C., Romani N. und Schuler G. 1990. Disappearance of certain acidic organelles (endosomes and Langerhans cell granules) accompanies loss of antigen processing capacity upon culture of epidermal Langerhans cells. *J. Exp. Med.* 172:1471

Strannegard O., Hermodsson S. und Westberg G. 1982. Interferon and natural killer cells in systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 50:246

Strobl H., Scheinecker C., Riedl E., Csmarits B., Bello-Fernandez C, Pickl W. F., Majdic O. und Knapp W. 1998. Identification of CD68+lin- peripheral blood cells with dendritic precursor characteristics. *J. Immunol.* 161:740

Svensson H., Johannisson A., Nikkila T., Alm G. V. und Cederblad B. 1996. The cell surface phenotype of human natural interferon-alpha producing cells as determined by flow cytometry. *Scand. J. Immunol.* 44:164

Takashima S., Kitakaze M., Asakura M., Asanuma H., Sanada S., Tashiro F., Niwa H., Miyazaki Ji J., Hirota S., Kitamura Y., Kitsukawa T., Fujisawa H., Klagsbrun M. und Hori M. 2002. Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99:3657

Tarlinton D. 1998. Germinal centers: form and function. *Curr. Opin. Immunol.* 10:245

Tordjman R., Lepelletier Y., Lemarchandel V., Cambot M., Gaulard P., Hermine O. und Romeo P. H. 2002. A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nat. Immunol.* 3:477

Valladeau J., Ravel O., Dezutter-Dambuyant C., Moore K., Kleijmeer M., Liu Y., Duvert-Frances V., Vincent C., Schmitt D., Davoust J., Caux C., Lebecque

- S. und Saeland S. 2000. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 12:71
- Vallin H.**, Perers A., Alm G. V. und Ronnblom L. 1999. Anti-double-stranded DNA antibodies and immunostimulatory plasmid DNA in combination mimic the endogenous IFN-alpha inducer in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 163:6306
- Vallin H.**, Blomberg S., Alm G. V., Cederblad B. und Ronnblom L. 1999. Patients with systemic lupus erythematosus (SLE) have a circulating inducer of interferon-alpha (IFN-alpha) production acting on leucocytes resembling immature dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 115:196
- Verhasselt V.**, Buelens C., Willems F., De Groote D., Haeffner-Cavaillon N. und Goldman M. 1997. Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway. *J. Immunol.* 158:2919
- Watson S. R.** und Bradley L. M. 1998. The recirculation of naive and memory lymphocytes. *Cell. Adhes. Commun.* 6:105
- Weis W. I.**, Taylor M. E. und Drickamer K. 1998. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol. Rev.* 163:19
- Winzler C.**, Rovere P., Rescigno M., Granucci F., Penna G., Adorini L., Zimmermann V. S., Davoust J. und Ricciardi-Castagnoli P. 1997. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J. Exp. Med.* 185:317
- Yamaguchi Y.**, O'Doherty U., Peng M. und Steinman R. M. 1995. Difficulties in obtaining monoclonal antibodies to subsets of human leukocytes, using neonatal tolerance induction in mice. *J. Immunol. Methods.* 181:115
- Yin A. H.**, Miraglia S., Zanjani E. D., Almeida-Porada G., Ogawa M., Leary A. G., Olweus J., Kearney J. und Buck D. W. 1997. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90:5002
- Ytterberg S. R.** und Schnitzer T. J. 1982. Serum interferon levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis. Rheum.* 25:401

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von April 1998 bis April 2002 unter der Betreuung von Priv. Doz. Dr. Ralf Küppers und Dr. Jürgen Schmitz in den Laboratorien der Firma Miltenyi Biotec GmbH in Bergisch Gladbach angefertigt.

Die Liste der Danksagungen ist lang und sicher nicht vollständig. So möchte ich mich zunächst ganz herzlich bei Ralf Küppers für die Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Jürgen Schmitz. Seine uneingeschränkte Unterstützung, fachliche Betreuung und kritischen Kommentare machten die erfolgreiche Durchführung dieser Arbeit erst möglich.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei David Buck, Marina Cella und Marco Colonna bedanken. Die Zusammenarbeit mit Ihnen bleibt mir unvergessen.

Ein herzliches Dankeschön gilt allen Mitarbeitern der Firma Miltenyi Biotec GmbH, hier insbesondere Heike Leyendeckers, Gregor Winkels, Alexander Horst und Verena Martin für ein tolles Arbeitsklima und ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Der Firma Miltenyi Biotec bin ich zu großem Dank verpflichtet für die finanzielle Unterstützung und die Bereitstellung von Arbeitsplatz und Reagenzien.

Der größte Dank gilt meinen Eltern und Julia Duwendag für die moralische Unterstützung, ihren Rat, aber vor allem für ihre Geduld mir gegenüber während meiner Promotionszeit.

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass ich Teile der Arbeit, die von anderen Personen durchgeführt wurden, kenntlich gemacht und die jeweiligen Personen namentlich erwähnt habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Priv. Doz. Dr. Ralf Küppers betreut worden.

Teilpublikationen:

1. Dzionek A., Fuchs A., Schmidt P., Cremer S., Zysk M., Miltenyi S., Buck D. W. und Schmitz J. 2000. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 165:6037
2. Dzionek A., Sohma Y., Nagafune J., Cella M., Colonna M., Facchetti F., Gunther G., Johnston I., Lanzavecchia A., Nagasaka T., Okada T, Vermi W., Winkels G., Yamamoto T., Zysk M., Yamaguchi Y. und Schmitz J. 2001. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon α/β induction. *J. Exp. Med.* 194:1823
3. Dzionek A., Inagaki Y., Okawa K., Nagafune J., Rock J., Sohma Y., Winkels G., Zysk M., Yamaguchi Y. und Schmitz J. 2002. Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum. Immunol.* 63:1133

Köln, Mai 2003

Andrzej Dzionek

Abstract

Studies of BDC have been hampered by their scarcity and the lack of specific cell surface markers. Cell surface markers cannot only be used in order to characterize and isolate the cells, but they also determine the function of DC.

Here, using contralateral footpad immunization procedure combined with a powerful BDC isolation technique, a panel of new mAb has been generated, which recognize three novel BDC-specific antigens: BDCA-2, BDCA-3 and BDCA-4. BDCA-3 is expressed on CD11c⁺ CD123⁻ myeloid BDC and is identical to thrombomodulin, a molecule involved in coagulation processes. In contrast, BDCA-2 and BDCA-4 are both restricted to CD11c⁻ CD123⁺⁺ PDC. BDCA-4 is identical to neuropilin-1, a neuronal receptor involved in the axon guidance. In addition, neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as a receptor for VEGF-A and plays a major role in angiogenesis. In the hematopoietic system expression of BDCA-4 is upregulated after stimulation or culture on a number of cells including monocytes, BDC and T cells. Nevertheless, the function of both BDCA-3 and BDCA-4 on BDC has still to be elucidated.

Molecular cloning of BDCA-2 revealed, that BDCA-2 is a new type II c-type lectin showing 50,7% sequence identity at the amino acid level to its putative murine orthologue Dectin-2. Anti-BDCA-2 mAbs are rapidly internalized after binding to BDCA-2 and efficiently presented to T-cells indicating that BDCA-2 can function in both ligand internalization and presentation. Furthermore, ligation of BDCA-2 suppresses INF- α/β production and thereby promotes CD40-ligand dependent IL12 p70 production by PDC. These process is presumably dependent on calcium mobilization and protein-tyrosine phosphorylation by Src-family protein-tyrosine kinases. Since INF- α/β and IL-12 exert pleiotropic and partially overlapping functions, it is rather difficult to predict the *in vivo* consequences of switching from INF- α/β -controlled to IL-12-controlled immune response following BDCA-2 ligation. Nevertheless, as production of IFN- α/β by PDCs is believed to be a key pathophysiological factor in SLE, BDCA-2 represents an attractive target for blocking production of IFN- α/β in SLE patients.

Lebenslauf

Andrzej Krzysztof Dzionek
Kattowitzerstr. 26
51065 Köln

Köln, Mai 2003

- | | |
|----------------------------------|---|
| 29. November 1971 | geboren als Sohn von Malgorzata und Krzysztof Dzionek in Wagrowiec, Polen |
| 1978-1986 | Grundschule in Torun, Polen |
| 1986-1989 | Kopernicus-Gymnasium in Torun, Polen |
| 5. März 1989 | Einwanderung in die Bundesrepublik Deutschland |
| 1989-1992 | Genoveva-Gymnasium in Köln |
| 1992 | Abitur |
| 1992 – 1998 | Studium der Biologie an der Universität zu Köln |
| 1994 | Vordiplom |
| 1998 | Diplom im Fach Biologie an der Universität zu Köln |
| 1998-2002 | Promotionsstudium an der Universität zu Köln |
| April 1998-
August 1998 | Aufenthalt bei der Firma AmCell Corp. in Sunnyvale, Kalifornien, USA, im Rahmen einer wissenschaftlichen Kooperation |
| September 2000-
November 2000 | Aufenthalt an dem Baseler Institut für Immunologie im Rahmen einer wissenschaftlichen Kooperation |
| seit April 2002 | Berufstätigkeit als Projektleiter in der Forschungs & Entwicklungsabteilung der Firma Miltenyi Biotec GmbH in Bergisch Gladbach |