

# **Wirkung von Interleukin-16 auf Funktion und Differenzierung von humanen Monozyten und dendritischen Zellen**

Dem Fachbereich Biologie der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biol. Bianca Zickler

geboren am 05.07.1973 in Hannover

2001

Referent: Prof. Dr. A. Emmendorffer

Korreferent. Prof. Dr. W. Müller

Tag der Promotion: 23.05.2001

## Abstract

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von IL-16 auf humane Monozyten und DC *in vitro* untersucht. Hierzu wurden zunächst humane Monozyten, die mittels Elutriation aus PBMC gewonnen wurden mit IL-16 stimuliert und auf phänotypische und funktionelle Veränderungen im Vergleich zu unbehandelten Monozyten untersucht. Das Oberflächenantigen und gleichzeitiger Aktivierungsmarker CD25 war nach Stimulation der Monozyten viel stärker exprimiert als bei den unbehandelten Zellen. Zusätzlich konnte eine Induktion und Sekretion der Zytokine und Chemokine IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1 und RANTES durch die Stimulation mit IL-16 gezeigt werden. IL-12 konnte nicht detektiert werden. Neben der Veränderung der Zellfunktion konnte die chemotaktische Wirkung von IL-16 auf Monozyten gezeigt werden. Frisch isolierte Monozyten wurden nicht von IL-16 angezogen. Erst nach Kultivierung der Zellen für 24h konnte eine chemotaktische Wirkung von IL-16 auf die Monozyten nachgewiesen werden. Zusätzlich zur Erforschung der Wirkung von IL-16 auf Monozyten, wurde der Effekt von IL-16 auf humane DC *in vitro* untersucht. Unreife DC wurden aus Monozyten durch Zugabe von GM-CSF und IL-4 generiert. Der bestmögliche Zeitpunkt für eine Stimulation der Zellen war Tag 7 der Kultur. An diesem Tag war die Expression des DC typischen Oberflächenantigens CD1a am höchsten und die Zellen hatten eine maximale Größe erreicht. Die mit IL-16 stimulierten DC exprimierten mehr CD25, CD40, CD54, CD83, CD86 und HLA-DR auf der Zellmembran während die Expression von CD4 und CD14 im Vergleich zu unbehandelten DC verringert war. Dies zeigte deutlich, dass DC durch Stimulation mit IL-16 ausreifen können. Zusätzlich wurden die Zellen auf die Induktion und Sekretion verschiedener Zytokine und Chemokine untersucht. Es konnten IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , MCP-1 und RANTES nachgewiesen werden. IL-12 konnte auch hier wie bei den Monozyten nicht detektiert werden. Die DC ließen sich aufgrund dieses charakteristischen Zytokinmusters zu den DC2-Zellen einordnen. Daneben sind die IL-16 stimulierten DC besser in der Lage, T-Zellen in der MLR zu aktivieren im Vergleich zu den unreifen unbehandelten DC. Die Wirkungen von IL-16 auf unreife DC sind unabhängig von TNF- $\alpha$ . Dies konnte durch Zugabe eines TNF- $\alpha$  Antikörpers gleichzeitig zur Stimulation mit IL-16 gezeigt werden. Der Antikörper konnte die Ausreifung und damit verbundene Zunahme der Expression von Oberflächenantigenen wie CD40 und CD83, sowie die Sekretion von IL-10 nicht verändern. Auch die Fähigkeit der DC, T-Zellen in der MLR zu stimulieren, wurde nicht verändert. Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass IL-16 eine Wirkung auf die humane antigenpräsentierende Zellen wie Monozyten und DC hat. Diese Zellen können durch IL-16 stimuliert und zu einer Produktion von Th2-Zellen aktivierenden Zytokinen angeregt werden. Diese Ergebnisse können helfen, die Rolle von IL-16 bei allergischen Reaktionen besser zu verstehen und IL-16 als einen möglichen Zusatz bei der Kultivierung und Generierung von DC *in vitro* zu therapeutischen Zwecken zu charakterisieren.

Stichwörter: Monozyten, dendritische Zellen, Interleukin-16 und Tumor Nekrose Faktor alpha

## Abstract

In this study we have analysed the effects of IL-16 on human monocytes and DC *in vitro*. First, human Monocytes were isolated from PBML by centrifugal elutriation and then stimulated with IL-16. The IL-16 treated cells were tested for phenotypic and functional changes in comparison to untreated monocytes. The cell surface antigen CD25 was increased after stimulating monocytes with IL-16 and the induction and secretion of the cytokines and chemokines IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1 and RANTES were shown after IL-16 treatment. IL-12 was not detectable. Besides these changes in cell function the chemoattractant effects of IL-16 on human monocytes were shown. IL-16 could not chemoattract freshly isolated monocytes even after culturing the cells for 24h, IL-16 acts as a chemoattractant factor on these monocytes.

To further investigate the role of IL-16, human dendritic cells were treated with this cytokine. Immature DC were generated from human monocytes by addition of GM-CSF and IL-4. Day 7 of DC culture was the best point of time to stimulate the cells with IL-16. At this day the cells expressed the highest level of DC typical CD1a antigen and the cells were grown up to a maximum size. DC stimulated with IL-16 expressed more CD25, CD40, CD54, CD83, CD86 and HLA-DR on the cell surface but the expression of CD4 and CD14 were decreased compared with untreated DC. These results showed IL-16 as a potent factor to stimulate immature DC to become mature. In further experiments the induction and secretion of different cytokines and chemokines were tested. IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , MCP-1 and RANTES were detected. IL-12 was not detectable in DC supernatant. These characteristic production of cytokines indicated that these IL-16 treated DC belong to the DC2. Further the IL-16 treated DC were more potent activators of T-cells in the MLR in comparison to untreated DC. The effects of IL-16 on immature DC are independent from TNF- $\alpha$ . A TNF- $\alpha$  neutralizing antibody was added to the DC culture in addition to IL-16. This antibody could not influence the decrease of cell surface CD40 and CD83 and the secretion of IL-10 on IL-16 treated DC. The ability of these DC to stimulate T-cells in the MLR was not modified after antibody treatment.

These results showed the effects of IL-16 on human antigen presenting cells like monocytes and DC. IL-16 could activate these cells and stimulate them to produce Th-2-cell activating cytokines. Further these results could help, to understand the role of IL-16 in allergic diseases and characterize IL-16 as a supplement for the culture and generation of DC *in vitro* for therapeutical applications.

keywords: monocytes, dendritic cells, interleukin-16 and tumor necrosis factor

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Peripheres Blut .....	1
1.2 Monozyten .....	2
1.2.1 Mononukleäres Phagozytensystem (MPS).....	2
1.2.2 Entstehung von Monozyten und Makrophagen.....	2
1.2.3 Eigenschaften und Funktionen von Monozyten .....	3
1.3 Dendritische Zellen (DC) .....	5
1.3.1 Entstehung von dendritischen Zellen .....	5
1.3.2 Eigenschaften und Funktionen der reifen dendritischen Zellen .....	6
1.3.3 Eigenschaften von unreifen DC .....	7
1.4 Interleukin-16 .....	8
1.5 Ziele der vorglegten Arbeit.....	10
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>11</b>
2.1 Chemikalien.....	11
2.2 Herstellernachweis.....	13
2.3 Primärzellen.....	14
2.3.1 Monozyten .....	14
2.3.2 T-Lymphozyten.....	14
2.4 Bakterien.....	14
2.5 Medien und Seren.....	14
2.6 Puffer und Lösungen.....	15
2.7 Zytokine.....	19
2.8 Antikörper.....	19
2.8.1 Antikörper für die DC-Behandlung.....	19
2.8.2 Antikörper für die Durchflußzytometrie .....	19
2.9 Isotope .....	20
2.10 Herstellung von rekombinantem Interleukin-16 (IL-16) .....	21
2.10.1 Anzucht und Stimulation der Bakterien .....	21
2.10.2 Isolierung von IL-16 aus E.coli.....	21
2.10.3 Aufreinigung von IL-16 .....	21
2.10.4 Gewinnung der unstimulierten Proteine .....	22
2.10.5 Proteinbestimmung .....	22
2.10.6 Gelelektrophorese (SDS-Page) .....	22
2.10.7 Native Gelelektrophorese.....	23
2.10.8 Färben der Proteinbanden .....	24
2.10.9 LPS-Bestimmung in der IL-16 Präparation.....	24

2.11 Präparation der Zellen .....	25
2.11.1 Isolation der mononuklearen Leukozyten mit Ficoll.....	25
2.12 Elutriation .....	25
2.12.1 Versuchsaufbau.....	25
2.12.2 Prinzip der Zelltrennung bei der Elutriation .....	26
2.12.3 Durchführung der Elutriation.....	27
2.12.4 Bestimmung der Zellzusammensetzung der Elutriationsfraktionen .....	27
2.13 Stimulierung der Monozyten mit IL-16.....	28
2.14 Kultivierung der Monozyten zur Differenzierung zu dendritischen Zellen .....	28
2.15 Stimulierung der DC mit IL-16 .....	28
2.16 Chemotaxis .....	29
2.16.1 Prinzip der Chemotaxis.....	29
2.16.2 Aufbereitung der frischen Monozyten .....	29
2.16.3 Adhärenz der Monozyten für die Chemotaxis.....	29
2.16.4 Aufbereitung der DC für die Chemotaxis .....	30
2.16.5 Durchführung der Chemotaxis.....	30
2.17 Zellanalyse im FACScan™ .....	31
2.18 Analyse der Genexpression in Monozyten und DC.....	32
2.18.1 RNA-Isolierung aus Zellen .....	32
2.18.2 Konzentrationsbestimmung.....	32
2.18.3 RNase Protection Assay ( RPA) RiboQuant™ .....	32
2.19 ELISA .....	33
2.20 Proliferationstest (MLR: mixed lymphocyte reaction).....	33
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
3.1 Herstellung von rekombinantem Interleukin-16.....	34
3.1.1 Proteinbestimmung .....	34
3.1.2 SDS-Gel.....	35
3.1.3 Natives Gel .....	36
3.1.4 Bestimmung der LPS Konzentration in der IL-16-Lösung .....	37
3.2 Zellgewinnung .....	37
3.2.1 Monozytenaufreinigung .....	37
3.3 Stimulierung von Monozyten .....	39
3.3.1 Durchflußzytometrie: CD25 Expression bei Monozyten .....	40
3.3.2 Einfluss von IL-16 auf die Expression verschiedener Zytokin- und Chemokingene in Monozyten .....	41
3.3.3 Zytokin und Chemokinkonzentrationen in den Überständen von Monozyten .....	42
3.3.4 Chemotaktische Wirkung von IL-16 auf Monozyten.....	48
3.4 Differenzierung von Monozyten zu DC .....	51
3.4.1 Expression verschiedener Oberflächenantigene im Verlauf der DC Differenzierung .....	51

3.5 Stimulierung der DC mit IL-16 .....	57
3.5.1 Einfluss von IL-16 auf die Expression verschiedener Oberflächenantigene .....	57
3.5.2 Proliferationstest: MLR (mixed lymphocyte reaction).....	66
3.5.3 Einfluss von IL-16 auf die Induktion verschiedener Zytokin- und Chemokingene .....	68
3.5.4 Einfluss von IL-16 auf die Zytokin- und Chemokinproduktion bei DC.....	69
3.5.5 Chemotaktische Wirkung von IL-16 auf DC .....	74
3.6 Kultur von DC mit einem TNF- $\alpha$ Antikörper .....	76
3.6.1 Einfluss des TNF- $\alpha$ AK auf die Expression verschiedener Oberflächenantigene.....	76
3.6.2 Nachweis von TNF- $\alpha$ und IL-10 im ELISA .....	80
3.6.3 Einfluss des TNF- $\alpha$ AK auf die MLR.....	82
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>84</b>
4.1 Zellisolierung.....	84
4.2 Einfluss von IL-16 auf Monozyten.....	85
4.3 Einfluss von IL-16 auf dendritische Zellen .....	87
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>91</b>
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>92</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
Ag	Antigen
AK	Antikörper
APC	Antigen präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CD	engl.: Cluster of Differentiation
DC	dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxy ribonucleic acid)
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzym-gekoppelte Immunabsorptionsbestimmung (engl.: Enzym linked immuno absorbent assay)
EDTA	Ethylendiamintetra Essigsäure ( engl.: ethylendiaminetetraacetic acid)
FACS	Durchflußzytometer (engl.: fluorescence activated cell sorter)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
GTC	Guanidinthiocyanat
h	Stunde
<sup>3</sup> H	Tritium
HPRT	Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyl Transferase
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1Ra	Interleukin-1 Rezeptor Antagonist
LPS	Lipopolysaccharid
kDa	Kilodalton
mAK	monoklonaler Antikörper
M	Molar
MCP	engl.: monocyte chemotactic protein
mg	Milligramm
M-CSF	Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor



MHC	Haupt-Gewebeverträglichkeitskomplex (engl.: major histocompatibility complex)
min	Minute
ml	Milliliter
MLR	engl.: mixed lymphocyte reaction
mRNA	engl.: messenger RNA
μ	mikro
n	nano
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PBMC	Mononukleäre Zellen des humanen Blutes (engl.: peripheral blood mononuclear cells)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration (lat.: potentia Hydrogenii)
r	rekombinant
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
RPA	(engl.: RNase protection assay)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: Sodiumdodecylsulfate)
SSC	Seitwärtslichtstreuung (engl.: sidescatter)
TCR	T-Zellrezeptor (engl.: T-cell-receptor)
TEMED	Tetramethyl-Ethylendiamin
Th1	T-Helfer-1
Th2	T-Helfer-2
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Einheiten (engl.: Units)
Upm	Umdrehung pro Minuten
z.B.	zum Beispiel

# 1 Einleitung

Das Immunsystem soll den Körper vor Schaden durch eingedrungene Bakterien, Viren sowie Parasiten schützen. Dafür muss das Immunsystem in der Lage sein, diese Eindringlinge zu identifizieren und von den körpereigenen Strukturen zu unterscheiden. Um auf die enorme Vielzahl möglicher fremder Molekülstrukturen reagieren zu können, benötigt das Immunsystem ein sehr großes Repertoire verschiedener Lymphozyten. Eine sehr wichtige Rolle spielen in diesem System die antigenpräsentierenden Zellen, vor allem dendritische Zellen aber auch Monozyten und Makrophagen. Diese Zellen phagozytieren eingedrungene körperfremde Strukturen und präsentieren die Bruchstücke den Lymphozyten, damit diese zu T-Helfer 1 Zellen, T-Helfer 2 Zellen oder zytotoxischen T-Zellen aktiviert bzw. als B-Lymphozyten zur Antikörperproduktion sowie Produktion verschiedener Zytokine angeregt werden. Monozyten wie auch DC lassen sich durch verschiedene Stoffe wie z.B. LPS aktivieren und können dann anschließend ihre Aufgaben im Immunsystem ausführen.

## 1.1 Peripheres Blut

Das Blutmenge des Menschen beträgt 7-8 % des Körpergewichts. Bei einem erwachsenen Menschen mit 70 kg Körpergewicht entspricht dies 5 -5,5 Liter Blut. Davon entfallen auf die Blutzellen etwa 45 % und auf das Blutplasma etwa 55 % des Volumens.

Das periphere Blut hat neben der Transportfunktion für z.B. Sauerstoff und Nährstoffe noch eine immunologische Bedeutung. Es enthält neben Erythrozyten für den Sauerstoff- und CO<sub>2</sub>-Transport und Thrombozyten für die Blutgerinnung auch viele immunkompetente Zellen, die Leukozyten, zu denen Lymphozyten, NK-Zellen, Granulozyten sowie Monozyten gehören.

Die Leukozytenmenge bei Erwachsenen beträgt 4.000 bis 9.000 Zellen / µl. Die Leukozyten setzen sich aus verschiedenen Zellpopulationen zusammen. Ihre prozentuale Verteilung ist aus Tabelle 1 zu entnehmen.

Tab. 1: Prozentuale Verteilung der Leukozyten im Blut

Neutrophile Granulozyten	55–70 %
Eosinophile Granulozyten	2–4 %
Basophile Granulozyten	0–1 %
Monozyten	2–6 %
Lymphozyten	25–40 %

## 1.2 Monozyten

### 1.2.1 Mononukleäres Phagozytensystem (MPS)

Zum mononukleären Phagozytensystem zählen die Monoblasten, die Promonozyten, die Monozyten und die Makrophagen.

Ursprünglich wurden alle Zellen, die in der Lage sind durch Phagozytose Partikel aufzunehmen, zum retikuloendothelialen System (RES) zusammengefasst (Aschoff, 1924). Dies waren retikuläre Zellen, Endothelzellen, Fibroblasten, Histozyten und Monozyten. Als erkannt wurde, dass Makrophagen wichtige Funktionen besitzen und aus Monozyten entstehen, wurde der Begriff des mononukleären Phagozytensystems (MPS) eingeführt (van Furth et al., 1972). Dazu zählen alle Makrophagen-Vorläuferformen sowie die verschiedenen reifen Makrophagentypen.

Zur Identifizierung der einzelnen Zellen des MPS wurde intensive Forschungsarbeit betrieben (Lohmann-Matthes, 1981; Goud et al. 1975; Meutret et al. 1974).

### 1.2.2 Entstehung von Monozyten und Makrophagen

Monozyten und Makrophagen entstammen dem Knochenmark. Dieses enthält residierende Makrophagen und seine Vorstufen. Die Entwicklung der Monozyten beginnt mit der Vorläuferzelle CFU-GM (engl.: colony-forming unit granulocyte-Macrophage). Es wird angenommen, dass Makrophagen und neutrophile Granulozyten von der gleichen Vorläuferzelle abstammen (Metcalf, 1971).

Die unreifste Zelle des MPS ist der Monoblast. Aus ihm entsteht durch Zellteilung der Promonozyt und nach weiterer Zellteilung der Monozyt. Die neu gebildeten Monozyten bleiben eine Zeitlang im Knochenmark, treten dann in das periphere Blut ein und zirkulieren dort, bis sie in die Gewebe migrieren und dort zu Makrophagen ausdifferenzieren. Man findet sie z.B. als Kupffersche Sternzelle in der Leber, als Mesangiumzellen in der Niere, als Mikrogliazellen im Gehirn und als Alveolarmakrophagen in der Lunge.

Auf die Produktion und Reifung der mononukleären Phagozyten haben Wachstumsfaktoren, wie GM-CSF, M-CSF und Interleukin-3 Einfluss. Diese Faktoren werden durch unterschiedliche Zellen gebildet. So produzieren Makrophagen, die durch zu phagozytierende Partikel oder Endotoxine stimuliert wurden, selber M-CSF und GM-CSF (Jones et al., 1989; Thorenset al., 1987). Makrophagen bilden auch Interleukin-1 und TNF (Tumornekrosefaktor), durch die Fibroblasten und Endothelzellen zur Produktion von M-CSF und GM-CSF stimuliert werden (Broudy et al., 1986; Munker et al., 1986; Bagby et al.; 1986). Auch die Bildung von GM-CSF und Interleukin-3 durch T-Lymphozyten beeinflusst die Produktion der mononukleären Phagozyten (Cannistra et al., 1987). Es konnte gezeigt werden, dass die funktionelle und morphologische Entwicklung der unreifen mononukleären Phagozyten durch

verschiedene Stimuli beeinflussbar ist. So werden durch Stimulation mit M-CSF typische Makrophagen gebildet, während bei Stimulation mit Interleukin-2 eine „Natural-Killer“-Aktivität ausgebildet wird (Li et al., 1989).

### 1.2.3 Eigenschaften und Funktionen von Monozyten

Der Monozyt ist mit 15 µm Durchmesser die größte Zelle des peripheren Blutes. Die Gesamtzahl der zirkulierenden Monozyten im Blut eines Erwachsenen beträgt  $1,7 \times 10^9$ .

Monozyten können z.B. an Plastik adhärieren, wodurch sie sich von Promonozyten abgrenzen lassen. Des Weiteren können sie in das umliegende Gewebe auswandern und zu Makrophagen differenzieren. Dabei wachsen sie auf das fünffache Volumen an, die Phagozytosekapazität wird gesteigert und der Gehalt an hydrolytischen Enzymen im Lysosom erhöht sich. Makrophagen nehmen in den Organen spezielle Aufgaben wahr.

Monozyten und Makrophagen spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr von eingedrungenen Keimen. Im Gewebe sind die Makrophagen die ersten Zellen der Abwehr, auf die die Keime stoßen. Im Blut übernehmen die Monozyten diese Aufgabe. Sie nehmen zusammen mit den neutrophilen Granulozyten die Phagozytosefunktion wahr, wobei die neutrophilen Granulozyten die effizienteren Phagozyten sind.

Mikroorganismen, geschädigte Zellen, gealterte Erythrozyten und Immunkomplexe werden im allgemeinen phagozytiert und dann im Lysosom durch Enzyme oder die im „respiratory burst“ durch eine Oxidase erzeugten Sauerstoffradikale lysiert (Babior, 1987).

Die Phagozytose kann durch Opsonine erleichtert werden. Dabei gibt es für die drei Hauptklassen (IgG-Antikörper, Komplementfaktor C3b und Lektine) Rezeptoren auf den Phagozyten. Eingekapselte Bakterien können nur phagozytiert werden, wenn sie opsoniert sind.

Es gibt für Monozyten und Makrophagen die Möglichkeit des intrazellulären und extrazellulären Abtötens. Dabei dient die extrazelluläre Zytotoxizität der Zerstörung von Parasiten, Tumorzellen, transplantierten Zellen und virusinfizierten Zellen.

Zusätzlich zur spontanen Zytotoxizität tritt die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (engl.: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) auf. Hier werden Antikörper gegen die fremden Antigene gebildet und schließlich die mit Antikörpern besetzten Zellen über die Fc-Rezeptoren der Effektorzellen gebunden und zerstört. Effektorzellen können hierbei Granulozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Makrophagen und Monozyten sein. In Versuchen, in denen Antikörper gegen Tumorzellen eingesetzt wurden, konnte die zytotoxische Aktivität von Makrophagen gesteigert werden (Johnson et al., 1986).

Die Monozyten und Makrophagen verfügen über verschiedene zytotoxische Mechanismen: Die spontane Zytotoxizität, die ADCC nach Antikörperbildung und die Produktion von Lymphotoxinen (TNF-β) nach Stimulation mit LPS.

Zytotoxische Effektorfunktionen von Monozyten können durch viele Stimulanzen gesteigert werden, so z.B. durch IFN- $\gamma$ , IL-2 (Malkovsky et al., 1987; Kniep et al., 1986; Espinoza-Delgado et al., 1990) und durch Phorbol-Ester und Calcium-Ionophore, die eine IFN- $\gamma$ -Wirkung verstärken (Somers et al., 1986). Tumorzellen, die resistent gegen TNF-Einwirkung sind, können durch IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  aktivierte Makrophagen lysiert werden (Philip, 1988).

Monozyten und Makrophagen sind die ersten Zellen der Immunabwehr. Besondere Bedeutung haben sie aber nicht als Phagozyten, sondern als immunregulatorische Zellen. Sie sezernieren eine große Anzahl von Stoffen, wie z.B. Zytokine, Komplementfaktoren, Arachidonsäuremetaboliten und Enzyme.

Sie setzen Stoffe frei, die chemotaktisch wirken, so dass andere Zellen an den Entzündungsort gelockt werden. So werden z.B. neutrophile Granulozyten durch das von Monozyten gebildete IL-8 angelockt (Peveri et al., 1988).

Makrophagen sezernieren eine Vielzahl von Zytokinen und werden deshalb häufig in die Mitte des Zytokinnetzwerks gestellt. Durch die Sekretion von IL-1 und IL-6 (Ferreri et al., 1991) bewirkt der Makrophage eine Differenzierung der B-Zellen und regt die Antikörperproduktion an (Takatsuki et al., 1988), wobei IL-6 erst in der späten Phase der B-Zellaktivierung wirkt. IL-1 bewirkt eine Stimulation der Th2-Zellen, die daraufhin die Zytokine IL-4 und IL-5 sezernieren. Diese Zytokine bewirken eine B-Zellproliferation und -differenzierung, wobei zunächst IL-4 und später IL-5 die B-Zellentwicklung beeinflussen. IL-1 sowie IL-6 wirken außerdem als Pyrogene, d.h. sie können Fieber auslösen. Weiterhin führen sie zu einer Immunreaktion, die als Immunantwort der akuten Phase bezeichnet wird. Dabei induziert IL-6 in der Leber die Bildung von Proteinen der akuten Phase (Gauldie et al., 1987), die bei entzündlichen Prozessen Aufgaben des Komplementsystems ausüben. Innerhalb des zellulären Immunsystems greift IL-6 in die T-Zellaktivierung ein, indem es einen Kostimulus für IL-2 bei der Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen darstellt (Okada et al., 1989; Garman et al., 1987). Neben IL-6 wird in Makrophagen gleichzeitig IL-12, ein typisches Th1 Zytokin, gebildet, was die Wirkung von IL-6 verstärkt und zusätzlich NK-Zellen aktiviert, die durch zusätzliche Einwirkung von TNF- $\alpha$  zur IFN- $\gamma$ -Produktion angeregt werden. TNF- $\alpha$  wird ebenfalls von Makrophagen sezerniert und führt zu einer Entzündungsreaktion.

Eine weitere Funktion der Monozyten ist die Präsentation von Antigenen. Sie präsentieren das Antigen zusammen mit MHC-II-Antigenen den T-Helferzellen, die das Antigen nur in Verbindung mit körpereigenen Strukturen, also dem MHC -II, erkennen können.

Viele der genannten Funktionen erfordern, dass Monozyten in aktiviertem Zustand sind. Monozyten sind durch eine Vielzahl von Stoffen aktivierbar, so z.B. durch LPS, Interferon- $\gamma$ , Interferon- $\alpha$ , GM-CSF und Interleukin-2. Dabei ist Interferon- $\gamma$  der stärkste Aktivator mit den vielfältigsten Wirkungen. Suppressive Effekte können z.B. durch Prostaglandin E<sub>2</sub> und TGF- $\beta$  erzielt werden. Unter verschiedenen Bedingungen können einige Stoffe, so z.B. LPS, TNF, IFN- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ , stimulatorische oder suppressive Effekte haben (Adams, 1989).

Bei Monozyten ist die Aktivierung nicht mit Proliferation verbunden. Eine Proliferation findet primär im Knochenmark statt, so dass genügend Monozyten vorhanden sind, die auf pathologische oder physiologische Stimuli hin in das Gewebe wandern können. Aktivierung bedingt einen vorübergehenden Phänotyp mit funktionellen Änderungen. Die Makrophagenfunktion wird durch suppressive und steigernde Signale bestimmt, der Phänotyp reflektiert die Summe von Aktivierung und Deaktivierung (Caleda et al., 1994).

### 1.3 Dendritische Zellen (DC)

Dendritische Zellen (DC) sind die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen, die bei der Induktion der Immunantwort eine entscheidende Rolle spielen. Ihr Name stammt von ihrer ungewöhnlichen verzweigten Morphologie, die ähnlich wie bei Nervenzellen durch Fortsätze (Dendriten) gekennzeichnet ist. (Steinmann et al., 1973)

#### 1.3.1 Entstehung von dendritischen Zellen

Es gibt zwei unterschiedliche DC Typen, die verschiedene Eigenschaften und Funktionen besitzen. Zum einen die interdigitierenden DC, meist einfach DC genannt, findet man im Blut, im Interstitium der meisten Organe, sehr oft in den T-Zell-reichen Zonen der Lymphknoten und der Milz. Außerdem liegen sie verstreut in der Epidermis der Haut, wo sie als Langerhans-Zellen bezeichnet werden (Steinmann, 1973). Der zweite Typ von DC, die follikulären DC, kommen in den Keimzentren der Lymphfollikel in den Lymphknoten, der Milz und dem Mukosa-assoziierten Lymphgewebe vor, indem auch zahlreiche B-Zellen vorhanden sind (Kuby, 1992).

Die Interdigitierenden DC gehören zur Linie der mononukleären Phagozyten und stammen direkt von Knochenmarkstammzellen ab (Frelinger et al., 1979; Katz et al., 1979). DC sind mit Monozyten verwandt. Sie besitzen die gleichen MHC-II, L3B+, CD14 und CD4 Phänotypen (Gaudernack et al., 1985). Es konnte auch gezeigt werden, dass aus einer einzigen Stammzelle entstandene Knochenmarkzellpopulationen sowohl Monozyten/Makrophagen als auch DC enthielten (Goordyal et al., 1985), was die These von der myelodischen Herkunft der DC unterstützte.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten DC *in vitro* zu generieren. Aus Blutmonozyten können DC nach Zugabe bestimmter Zytokine wie IL-4, GM-CSF u.a. generiert werden (Sallusto et al., 1994; Sallusto et al., 1995; Romani et al., 1996; Reddy et al., 1997). Im Knochenmark sind DC-Vorläuferzellen, die CD34+ hämatopoetischen Stammzellen vorhanden. Durch die Wirkung von Zytokinen wie GM-CSF und IL-3 können sie zum Wachstum und zur Differenzierung zu DC stimuliert werden (Inaba et al., 1992; Saunders et al., 1996). Aus diesen CD34<sup>+</sup> Vorläuferzellen können zwei verschiedene DC-Populationen entstehen:

Langerhans-Zellen und interstitielle DC (Caux et al., 1996; Strunk et al., 1997). Trotz der bisherigen zahlreichen Untersuchungen ist die Frage der Herkunft der DC immer noch nicht vollständig geklärt.

Die folliculären DC stammen nicht aus dem Knochenmark und besitzen andere Phänotypen und Eigenschaften als die interdigitierenden DC (Matsumoto et al., 1997). Bis jetzt ist auch ihre Herkunft noch unbekannt.

### 1.3.2 Eigenschaften und Funktionen der reifen dendritischen Zellen

DC sind die effektivsten professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC), die bei der Immunantwort von großer Bedeutung sind. Einzig die DC sind in der Lage naive T-Lymphozyten zu aktivieren. DC sind im Vergleich zu anderen Leukozyten nur in sehr geringer Zahl im Blut vorhanden. Sie verändern ihren Phänotyp und tragen keinen stabilen Zellmarker während ihrer Differenzierung. Diese Charakteristika führen zu Schwierigkeiten bei ihrer Erforschung. Die Morphologie der DC zeichnet sich durch eine hohe Anzahl irregulärer, über 10µm langer verzweigter Fortsätze (Dendriten) aus, die sich in jede Richtung drehen, ausziehen oder zurückziehen können (Winzler et al., 1997). Diese Form und Mobilität der DC sind besonders geeignet für ihre Funktion, Antigene zu fangen und sie anschließend zu präsentieren.

Eine wichtige Aufgabe der DC ist es, Antigene zu präsentieren. Im Vergleich zu anderen APC exprimieren sie die 10-100fache Menge an MHC-Molekülen, besonders MHC-II Moleküle (Inaba et al., 1997). Bei einer Infektion werden eingedrungene Keime phagozytiert, in der Zelle prozessiert und anschließend zusammen mit MHC-II anderen Zellen präsentiert. Die DC zirkulieren so lange zwischen Lymphorganen, Milz und Lymphknoten, bis sie auf Ag-spezifische T-Zellen treffen. Als Folge proliferieren die T-Zellen und bringen weitere Immunreaktionen in Gang. Eine einzige DC ist in der Lage, 100-3000 T-Zellen zu stimulieren und gilt daher als Initiator der primären Immunantwort. Die T-Zell-Toleranz wird ebenfalls durch DC gewährleistet. Im Thymus präsentieren DC Selbst-Antigene. Thymozyten, die eine zu hohe Affinität zu diesen Ag besitzen, werden durch Aktivierung des Apoptose Programms deletiert. Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass DC auch bei der peripheren Toleranz eine wichtige Rolle spielen. Sie präsentieren Ag, die nur in bestimmten Geweben vorhanden sind und induzieren Anergie oder Deletion von T-Zellen, die fest an diese Ag binden.

DC besitzen viele Adhäsionsmoleküle und andere Oberflächenantigene die zur Kostimulation beitragen, wie z.B. CD40, CD54, CD58, CD86 (Caux et al., 1994). Die Expression dieser Moleküle erhöht sich, wenn DC Stress oder mikrobiellen Produkten ausgesetzt sind.

DC können sowohl CD8<sup>+</sup> wie auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen aktivieren. CD8<sup>+</sup> T-Zellen werden mittels MHC-I Molekülen zu starker Proliferation und schließlich zu einer zytotoxischen Reaktion angeregt (Bhardwaj et al., 1994). Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden über die MHC-II Moleküle der DC aktiviert. DC produzieren IL-12 und stimulieren die naiven T-Zellen zu IFN-

$\gamma$  produzierenden Th1-Zellen zu differenzieren. IFN- $\gamma$  aktiviert Makrophagen und induziert zusammen mit IL-12 die Bildung von Th1-Zellen aus T-Zellen. Bei Vorhandensein von IL-4 stimulieren die DC die Bildung von Th2-Zellen, welche IL-4 und IL-5 sezernieren. Diese Zytokine aktivieren Eosinophile und helfen B-Zellen bei der AK-Produktion.

In den letzten Jahren wurde auch die direkte Wirkung von DC auf die B-Zellen bekannt. DC induzieren die AK-Produktion und Proliferation der B-Zellen durch Sekretion löslicher Faktoren wie IL-12. Daneben können DC auch Ig-Klassenwechsel auslösen (Fayette et al., 1997).

Follikuläre DC kontrollieren direkt das Wachstum und die Differenzierung der B-Zellen in den Keimzentren. Sie stammen nicht aus dem Knochenmark und ihnen fehlen die üblichen Leukozytenmarker wie CD54. Sie präsentieren Ag für lange Zeit auf der Zelloberfläche und zirkulieren zur B-Zell-Zone in den Keimzentren, wo sie auf Ag-spezifische B-Zellen treffen. Ruhende B-Zellen scheinen Signale von DC zu benötigen, um zu überleben und erneut zu zirkulieren (Janeway et al., 1997).

### 1.3.3 Eigenschaften von unreifen DC

In den meisten Geweben des Körpers sind sog. unreife DC vorhanden. Sie verfügen über keinen oder nur sehr wenig Kostimulationsmoleküle wie CD40, CD54 oder CD86 und sind deshalb nicht in der Lage, naive T-Zellen zu stimulieren (Banchereau et al., 1998). Andererseits können sie jedoch besonders gut Ag fangen. Unreife DC können Partikel oder Mikroben durch Phagozytose aufnehmen. Diese Fähigkeit geht bei der Reifung teilweise verloren (Inaba et al., 1993). Daneben können DC die Mikropinocytose durchführen, wobei mit Flüssigkeit gefüllte Vesikel gebildet werden (Sallusto et al., 1995). Zusätzlich exprimieren unreife DC Rezeptoren, die Endocytose vermitteln können, wie z.B. C-Typ Lektinrezeptor, Fc $\gamma$ - und Fc $\epsilon$ -Rezeptor (Sallusto et al., 1994). Die o.g. Fähigkeiten ermöglichen es den DC, Ag schon in pico- oder nanomolaren Konzentrationen aufzunehmen, während andere APC Ag erst aufnehmen können, wenn ihre Konzentration im Mikromolarbereich ist (Sallusto et al., 1995). Sobald unreife DC Ag aufgenommen haben, findet eine Reihe von Veränderungen des Phänotyps und der Funktion der Zellen statt, bevor sie die Ag den T-Zellen präsentieren können. Die Expression von Oberflächenmolekülen und die Produktion von IL-12 werden erhöht, die Fähigkeit zur Phagozytose, Endocytose und Mikropinocytose gehen z.T. verloren und die unreifen DC differenzieren zu reifen DC. Der Vorgang der Reifung lässt sich durch viele Faktoren wie z.B. LPS, verschiedene Zytokine wie TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-1 oder CD40L induzieren. Inhibiert wird die Reifung durch IL-10 (Buelens et al., 1997).



## 1.4 Interleukin-16

Interleukin-16 (IL-16) wurde erstmals 1982 im Überstand von ConA stimulierten humanen Lymphozyten entdeckt und als T-Zell spezifischer chemotaktischer Faktor beschrieben (Center et al., 1982; Cruikshank et al., 1982). IL-16 wurde aufgrund dieser Wirkung ursprünglich LCF (engl. lymphocyte chemoattractant factor) genannt. Diese Bezeichnung wurde in IL-16 geändert, als weitere Funktionen bekannt wurden.

IL-16 ist ein Homotetramer mit einem Molekulargewicht von 56 kDa bestehend aus vier nicht kovalent gebundenen identischen 14-17 kDa Untereinheiten. Eine Untereinheit besteht aus 130 Aminosäuren. Nur die tetramere Form zeigt biologische Aktivität. IL-16 hat einen ungewöhnlich hohen isoelektrischen Punkt von 9,0 bis 9,1 und besitzt keine Verwandtschaft mit bereits bekannten Chemokinen oder anderen beschriebenen chemotaktischen Zytokinen (Cruikshank et al., 1994).

IL-16 wird von CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten nach Stimulation mit Antigen, Mitogen (Center et al., 1982), Histamin (Center et al., 1983; Laberge et al., 1995) oder Serotonin (Laberge et al., 1996) sezerniert. Histamin bindet an den H2-Typ des Histaminrezeptors auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Hessel et al., 1995; Berman et al., 1984), während Serotonin die IL-16 Sekretion durch Bindung an den 5<sub>2</sub>-Rezeptor induziert (Laberge et al., 1996).

Die Stimulierung von CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten mit Histamin oder Serotonin führt nicht zu einer Transkription, Translation oder Neusynthese von IL-16 in der Zelle. Außerdem erfolgt auch keine Stabilisierung der IL-16 mRNA (Laberge et al., 1995; Vannier et al., 1993). Es konnte gezeigt werden, dass IL-16 konstitutiv synthetisiert wird und in einem noch unbekanntem cytoplasmatischem Kompartiment der Zelle bis zur Sekretion gespeichert wird (Laberge et al., 1995). Eine Sekretion erfolgt 2-4 Stunden nach Stimulation mit Histamin oder 1-2 Stunden nach Stimulation mit Serotonin. Der Mechanismus der IL-16 Sekretion ist noch unbekannt.

Northern Blot Analysen konnten eine einzelne mRNA von ungefähr 2600 Basenpaaren identifizieren. Ein offenes Leseraster (ORF engl. open reading frame) auf der IL-16 cDNA codiert für ein viel größeres Vorläuferprotein als das sezernierte 14 kDa Protein. Dieses Vorläuferprotein hat eine Größe von ca. 80 kDa. Die nicht translatierte Region am 3' Ende der mRNA enthält drei AUUUA-Sequenzen und zwei Polyadenylierungssignale (Cruikshank et al., 1994). Die mRNA wird konstitutiv in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten exprimiert und besitzt eine Halbwertszeit von zwei Stunden. Das Gen für IL-16 ist auf dem Chromosom 15 lokalisiert.

Das Vorhandensein eines intrazellulären 80 kDa IL-16-Vorläuferproteins lässt den Schluss zu, dass das Protein erst nach einem Proteinprozessing des Vorläuferproteins und Bildung eines Porenkomplexes in der Membran sezerniert wird. Dieses Vorläuferprotein ist konstitutiv in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen vorhanden. Es konnte jedoch nur in CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch eine konstitutiv vorhandene prozessierte bioaktive Form von IL-16 nachgewiesen werden (Laberge et al., 1995; Laberge et al., 1996).

IL-16 ist ebenfalls in Epithelzellen der Luftwege sowie der BAL (bronchoalveoläre Lavage) von Asthmapatienten vorhanden. Das IL-16 wird auch hier erst nach Stimulation mit Histamin bzw. Allergen freigesetzt. (Bellini et al., 1992; Krug et al., 2000).

IL-16 bindet an den CD4 Rezeptor auf Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten. Die chemotaktische Aktivität von IL-16 auf Monozyten ist proportional zur CD4 Expression auf der Zellmembran der Monozyten (Bellini et al., 1993). Die Bindungsstelle für IL-16 auf dem CD4- Rezeptor stimmt nicht mit der Bindungsstelle für MHC (engl. major histocompatibility complex) und dem gp 120 Proteins des HIV-1 überein (Theodore et al., 1996). Neueste Studien zeigen, dass es wahrscheinlich neben CD4 noch einen Korezeptor für IL-16 geben muss. IL-16 wirkt chemotaktisch auf Leukozyten von CD4 Knockout Mäusen (Mathy et al., 2000).

Weitere Studien zeigten, dass IL-16 einen Signaltransduktionsweg in der Zelle aktiviert. Es kommt zu einer Zusammenlagerung und zwar Tetramerisierung von CD4 Rezeptoren auf der Zellmembran. Dadurch kann die an CD4 assoziierte Tyrosinkinase aktiviert werden und eine Kaskade induzieren, die zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration sowie einem Anstieg der Inositoltriphosphatsynthese in der Zelle bei Lymphozyten und Monozyten führt. Gleichzeitig wird die Signaltransduktion über den TCR/CD3 Komplex inhibiert. Bei Zellenlinien die einen CD4-Rezeptor ohne intrazelluläre Domäne exprimieren, konnten diese Effekte nicht nachgewiesen werden (Cruikshank et al., 1991).

Diese Effekte wurden ursprünglich für die Signaltransduktion über den T-Zellrezeptor (TCR) beschrieben. Hierbei kommt es zu einer Zusammenlagerung von TCR/CD3 und dem CD4 Rezeptor auf der Membran der Zelle und infolgedessen zu einer Aktivierung assoziierter Tyrosinkinasen, die dann die Kaskade der Signaltransduktion auslösen und im Endeffekt zur Aktivierung DNA-bindender Proteine wie z.B. NF- $\kappa$ B führen. Diese DNA-bindenden Proteine induzieren spezifische Gentranskription, was zur Proliferation und Differenzierung der Zelle führt.

IL-16 wirkt chemotaktisch auf CD4<sup>+</sup> Leukozyten. Außerdem ist es ein Wachstumsfaktor für CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Es ermöglicht diesen Zellen, von der G<sub>0</sub> in die G<sub>1</sub> Phase des Zellzyklus zu wechseln, kann jedoch keine Zellteilung induzieren. Eine weitere Wirkung von Interleukin-16 ist der Anstieg der Expression von CD25 (=IL-2R $\alpha$ ) auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen 24 Stunden nach Stimulation mit IL-16 (Cruikshank et al., 1991). IL-16 kann jedoch die Synthese von IL-2 in T-Lymphozyten nicht induzieren. Außerdem ist ein Anstieg der HLA-DR Expression bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Monozyten nachweisbar (Cruikshank et al., 1987). Für CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten sind noch weitere Wirkungen von Interleukin-16 bekannt. Es kann die MLR (engl. mixed lymphocyte reaction) inhibieren (Theodore et al., 1996), die durch Antigen induzierte Proliferation hemmen, die Synthese einiger Zytokine induzieren und die Transkription von HIV hemmen (Baier et al., 1995). Eine andere Funktion von IL-16 wurde für eosinophile Granulozyten beschrieben. IL-16 führt bei eosinophilen Granulozyten zu einer Zunahme der Adhäsion an Matrixproteine.

## 1.5 Ziele der vorglegten Arbeit

IL-16 ist ein chemotaktisch wirkendes Zytokin, das bei allergischen Reaktionen wie dem allergischen Asthma eine wichtige Rolle spielt.

Ziele der hier vorgelegten Arbeit waren die Charakterisierung der Wirkung von IL-16 auf humane Monozyten und dendritische Zellen *in vitro*. Monozyten und DC sollten hinsichtlich ihrer phänotypischen und funktionellen Veränderungen nach einer Stimulation mit IL-16 analysiert werden.

Im ersten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob Monozyten durch IL-16 aktiviert werden können, was zum einen über die Analyse des Oberflächenantigens und Aktivierungsmarkers CD25 gezeigt werden sollte. Außerdem sollte die Induktion und Sekretion von Zytokinen und Chemokinen untersucht werden, um festzustellen, ob mit IL-16 stimulierte Monozyten eine allergische Reaktion unterstützen bzw. verstärken können.

In einem zweiten Ansatz sollten aus Monozyten *in vitro* generierte unreife DC mit IL-16 stimuliert werden. Dabei sollten die DC phänotypisch durch Analyse von DC typischen Oberflächenantigenen wie CD1a oder aber Aktivierungsmarkern wie z.B. CD40 und CD86 untersucht werden. Anhand dieser Charakterisierung sollte getestet werden, ob IL-16 zu einer Ausreifung von DC führen kann. Zusätzlich sollte wie bei den Monozyten, die Induktion und Freisetzung verschiedener Zytokine und Chemokine getestet werden. Aufgrund dieser Ergebnisse sollte der DC Typ festgestellt werden. Anhand des Zytokinmusters können DC entweder als DC des Typs 1 oder 2 eingestuft werden. Je nach DC Typ sind die Zellen in der Lage die Entwicklung von T-Zellen in Richtung TH1- oder TH2-Phänotyp zu beeinflussen. Daneben sollte die Fähigkeit der DC, T-Zellen in der MLR zu aktivieren, untersucht werden. Zusätzlich sollte geklärt werden, ob die Wirkungen von IL-16 auf DC unabhängig von dem nach IL-16 Stimulation gebildeten TNF- $\alpha$  waren, da TNF- $\alpha$  zur Aktivierung und Ausreifung von *in vitro* kultivierten DC benutzt werden kann. Die Erkenntnisse dieser Arbeit sollen dazu beitragen, die Rolle der DC bei allergischen Reaktionen näher zu charakterisieren und Ansatzpunkte für eine gezielte Modulation der DC Funktion *in vitro* aufzeigen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
<i>A</i>	
Acrylamid	Biorad
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Ampicillin	Boehringer
Aprotinin	Sigma
<i>B</i>	
Bacto-Hefeextrakt	Difco
Bacto-Trypton	Difco
Bromphenolblau	Biorad
Borsäure	Merck
<i>C</i>	
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck
Chloroform	Sigma
Coomassie Brilliantblau G	Sigma
<i>D</i>	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Biolabs
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck
<i>E</i>	
Essigsäure	Merck
Ethanol	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
<i>F</i>	
Ficoll-Paque	Amersham
Fötales Kälberserum	Gibco
<i>G</i>	
Glycerin	Serva
Glycin (Aminoessigsäure)	Sigma
GM-CSF	PeproTech
Guanidinthiocyanat (GTC)	Fluka
<i>H</i>	
Harnstoff	USB
<i>I</i>	
Isoamylalkohol	Sigma
Isopropanol	Roth

Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma
<i>K</i>	
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
<i>M</i>	
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck
Mercaptoethanol	Serva
Methanol	Roth
N,N-Methylenbisacrylamid (Bis)	Serva
Milchpulver (Non-Fat Dry Milk Blocker)	Biorad
<i>N</i>	
Natriumazetat	Merck
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS) Biomol	
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
Natriumfluorid (NaF)	Merck
Natriumpyrophosphat (Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> )	Merck
Natriumvanadat	Merck
Natronlauge (NaOH)	
p-Nitrophenyl- $\beta$ -d-Glucuronid	Sigma
Natriumzitat	Sigma
<i>P</i>	
Paraffinöl	Roth
Penicillin G	Gibco
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
o-Phenylendiamin (OPD)	Sigma
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	BioWhittaker
<i>S</i>	
Salzsäure (HCl)	Merck
Sarcosyl	Sigma
Streptavidin	Dako
Streptomycin	Gibco
<i>T</i>	
N,N,N',N'-Teramethyl-Ethylendiamin (TEMED)	Sigma
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Biomol
Triton X-100	Sigma
Tween 20	Biorad
<i>Z</i>	
Zinkchlorid (ZnCl <sub>2</sub> )	Merck

## 2.2 Herstellernachweis

Amersham Pharmacia	Freiburg, Deutschland
Beckmann Coulte	München, Deutschland
Becton Dickinson	Heidelberg, Deutschland
Biolabs	Schwalbach, Deutschland
Biomol	Hamburg, Deutschland
Biorad	München, Deutschland
BioWhittaker	Verviers, Belgien
Boehringer	Mannheim, Deutschland
Costar	Bodenheim, Deutschland
Desaga	Heidelberg, Deutschland
Dianova	Hamburg, Deutschland
Difco	Michigan, USA
Eppendorf	Berlin, Deutschland
Falcon	siehe Becton Dickinson
Fluka	Neu Ulm, Deutschland
Gibco	Eggenstein-Leopoldhafen, Deutschland
Greiner	Nürtingen, Deutschland
Jackson	siehe Dianova
Merck	Darmstadt, Deutschland
Millipore	Molsheim, Frankreich
Nunc	Wiesbaden-Biebrich, Deutschland
Pharmingen	siehe Becton Dickinson
Peprotec	New York, USA
Roth	Karlsruhe, Deutschland
Schleicher und Schuell	Dassel, Deutschland
Serva	Heidelberg, Deutschland
Sigma	München, Deutschland
USB	siehe Amersham
Whatman	siehe Desaga

## 2.3 Primärzellen

Die verwendeten Monozyten und Lymphozyten wurden aus Buffy-Coats isoliert. Die Buffy-Coats fielen bei der Herstellung von Blutkonserven an. Das Blut wurde zur Abtrennung der weißen Blutkörperchen zentrifugiert. Die weiße Schicht (Buffy-Coat), die hauptsächlich Leukozyten enthielt, wurde abgenommen. Die Buffy-Coats stammten von Blutspendern der Blutbank der Medizinischen Hochschule Hannover.

Für die Aufarbeitung wurden immer nur frische Buffy-Coats, die am Aufarbeitungstag gewonnen wurden, verwendet. Material von Spendern, das nicht für eine Bluttransfusion zugelassen worden wäre, wurde verworfen.

### 2.3.1 Monozyten

Die Monozyten wurden durch Elutriation bei der Rotorgeschwindigkeit 1900 Upm gewonnen, wie in Kapitel 2.11.3 beschrieben.

### 2.3.2 T-Lymphozyten

Die T-Lymphozyten wurden durch Elutriation bei der Rotorgeschwindigkeit 2300 Upm gewonnen und direkt nach der Isolierung wurden die Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml im Einfriermedium bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren.

## 2.4 Bakterien

Zur Produktion von rekombinantem IL-16 wurden transfizierte *E.coli* Bakterien (Stamm: DE3PL21) verwendet. Diese Bakterien waren eine freundliche Gabe von Herrn Dr. Krautwald.

## 2.5 Medien und Seren

### Einfriermedium

Zum Einfrieren der Zellen wurde ein Gemisch aus 90% FCS und 10% DMSO verwendet.

### Fötale Kälberserum (FCS)

Das FCS wurde von der Firma Sigma (Deisenhofen) bezogen. Das Komplement wurde durch Inkubation bei  $56^\circ\text{C}$  für 30 min inaktiviert.

**LB-Medium (Lurid-Bertram-Medium)**

Es wurden 10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefe-Extrakt und 5 g NaCl in einem Liter aqua bidest. gelöst und autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

**RPMI 1640**

Es wurde RPMI 1640 Medium der Firma Bio Whittaker verwendet. Dem Medium wurde eine Penicillin /Streptomycin-Lösung der Firma Gibco zugesetzt. Das Medium enthielt somit 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin. Das Medium wurde bei 4°C gelagert.

**2.6 Puffer und Lösungen****Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung**

Diese Lösung bestand aus 30% Acrylamid und 0,8% Bisacrylamid in aqua bidest

**10% Ammoniumpersulfat-Lösung**

1 g Ammoniumpersulfat wurde in 10 ml aqua bidest gelöst. Diese Lösung war bei 4°C 14 Tage haltbar.

**Bindungspuffer**

Dieser Puffer enthielt 5 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM TRIS/HCl, pH 7,9. Die Substanzen wurden eingewogen, in 950 ml aqua bidest. gelöst und der pH-Wert genau auf 7,9 eingestellt. Anschließend wurde der Puffer mit aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt, durch einen Faltenfilter filtriert und autoklaviert. Der Puffer wurde bei Raumtemperatur gelagert.

**CA<sup>2+</sup> Mg<sup>2+</sup>-Stammlösung für die Chemotaxis**

Es wurden 1,0g MgCl<sub>2</sub> und 1,324g CaCl<sub>2</sub> eingewogen und auf 100 ml aufgefüllt.

**Chloroform/ Isoamylalkohol Lösung**

Diese Lösung bestand aus 20 ml 2-Methyl-2- Butanol und 980 ml Chloroform.

**Coomassie-Färbelösung**

Für diese Färbelösung wurden 75 mg Coomassie Brilliantblau in einem Gemisch von 250 ml Methanol, 40 ml konzentrierter Essigsäure und 210 ml aqua bidest. gelöst.

**Elektrophorese-Laufpuffer**

Dieser Puffer bestand aus 25 mM TRIS, 0,192 M Glycin und 1 ml 20% SDS in 400 ml aqua bidest.



**Elutionspuffer**

Dieser Puffer wurde wie der Bindungspuffer hergestellt, nur dass hier 250 mM Imidazol eingesetzt wurden.

**Frackelton-Solubilisierungspuffer**

Dieser Puffer bestand aus 10 mM Tris, 50 mM NaCl, 30 mM Natriumpyrophosphat ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ), 50 mM NaF, 2 mM Jodacetamid (IAA), 5  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ , 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 100  $\mu\text{M}$  Natriumvanadat und 1% Triton X-100 (nach Sengupta et al., 1988). Da Natriumvanadat und PMSF in wässriger Lösung nur 14 Tage haltbar sind, wurde ein Stammpuffer aus den anderen Bestandteilen hergestellt, der länger haltbar war und auf einen pH-Wert von 7,05 eingestellt wurde. Dann wurde eine 10 mM Natriumvanadat-Lösung hergestellt. Dazu wurden 92 mg Natriumvanadat in 50 ml aqua bidest gelöst und mit 1 N HCl auf pH 9,5 eingestellt. Die Lösung wurde bei HCl-Zugabe gelb, durch kurzes Aufkochen verschwand die Farbe wieder. Kurz vor Gebrauch wurden zu 5 ml Stammlösung je 50  $\mu\text{l}$  der Natriumvanadat-Lösung und der PMSF-Lösung gegeben.

**Gellösung für den RPA**

Die Lösung bestand aus 79 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, 210g Harnstoff und 50ml 10x TBE-Puffer und wurde mit aqua bidest auf 500 ml aufgefüllt.

**Stoppuffer für die Chemotaxis**

Dieser Puffer diente bei den Versuchen zur Chemotaxis als Stoppuffer für die Enzymreaktion. Dafür wurden 15g Glycin in 450ml aqua bidest. gelöst, der pH-Wert mit Hilfe von Natriumhydroxyd-Plätzchen auf 10,3 eingestellt und mit aqua bidest. auf 500 ml aufgefüllt. Der Puffer wurde anschließend steril filtriert und bei 4°C gelagert

**GTC-Lösung**

250 g Guanidinthiocyanat (GTC) wurde in ein Gemisch von 17,6 ml einer 0,75 M Na-Citrat Lösung pH 7,2, 6,4 ml einer 10% Sarkosyl-Lösung und 293 ml aqua bidest. bei 65°C gelöst und lichtgeschützt aufbewahrt. Vor Gebrauch wurden 0,36 ml 2-Mercaptoethanol pro 50 ml Lösung zugegeben.

**FACS-Waschpuffer**

Der Puffer bestand aus PBS mit 0,02% Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ) und 2% FCS.

**Ficoll-Paque**

Ficoll-Paque wurde gebrauchsfertig von der Firma bezogen

**10% Milchpulver-Blocking-Lösung**

Diese Lösung enthielt 5g Trockenmilchpulver in 50 ml TTBS gelöst.

**Natriumazetat-Essigsäure-Puffer für die Chemotaxis**

Für Lösung a wurden 4,102 g Natriumazetat (wasserfrei) ad 500ml in aqua bidest gelöst. Für Lösung b wurden 3 ml konzentrierte Essigsäure vorgelegt und 497 ml aqua bidest dazugegeben. Danach wurde Lösung b zu Lösung a gegeben, bis ein pH-Wert von 4,0 erreicht war.

**Natriumazetat-Lösung**

Diese Lösung hatte eine Konzentration von 2M Natriumazetat und einen pH-Wert von 4,0.

**Phenol**

Phenol-Ultrapure (Amersham, Braunschweig) wurde bei 65 °C geschmolzen und mit dem gleichen Volumen aqua bidest zweimal ausgeschüttelt, so dass der pH-Wert in der wässrigen Phase 7,0 betrug. Das Phenol wurde bei 4°C gelagert.

**Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)**

PBS wurde gebrauchsfertig von der Firma BioWhittaker bezogen.

**PBS +Ca<sup>2+</sup> +Mg<sup>2+</sup> + BSA für die Chemotaxis**

Dem PBS-Puffer von Bio Whittaker wurden 10 ml der Ca<sup>2+</sup> Mg<sup>2+</sup>- Stammlösung und 0,1% BSA dazugegeben, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und die Lösung steril filtriert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

**PMSF-Lösung**

Es wurde eine 100 mM PMSF-Lösung hergestellt. Dazu wurden 17 mg PMSF in 1 ml Isopropanol gelöst und bei 4°C gelagert. PMSF war in wässriger Lösung nur 14 Tage haltbar.

**5x Probenpuffer (natives Gel)**

Dieser Puffer enthielt 50% 0,005 M Tris-Glycin-Puffer pH 9,0, 50% Glycerin und 0.025% Bromphenolblau.

**5x Probenpuffer (SDS-Page)**

Dieser Puffer enthielt 0,3125 M Tris / HCl pH 6,8, 50 % Glycerin, 10% SDS, 0,0125% Bromphenolblau und 3,5 M Mercaptoethanol.

**Proteinmarker**

Der von Biorad bezogene Marker bestand aus Proteinen mit den Molekulargewichten 83 kDa, 62 kDa, 47,5 kDa, 32,5 kDa, 25 kDa, 16,5 kDa

**Sammelgel-Puffer 4-fach**

Der Sammelgel-Puffer bestand aus 0,5 M Tris und 0,4% SDS in aqua bidest. und wurde mit HCl auf einen pH-Wert von 6,8 eingestellt.

Substrat für die Chemotaxis

p-Nitrophenyl- $\beta$ -d-Glucuronid diente als Substrat für den Enzymtest zum Nachweis der Chemotaxis. 100 mg wurden in 300 ml Natriumacetat-Puffer gelöst und bei -20°C gelagert.

**TBE-Puffer**

Dieser Puffer enthielt 0,9 M Trisbase, 0,9 M Borsäure und 25 mM EDTA. Der PH-Wert betrug 8,3.

**Trenngel-Puffer 4-fach**

Dieser Puffer bestand aus 1,5 M Tris und 0,4% SDS in aqua bidest und wurde mit HCl auf einen pH-Wert von 8,8 eingestellt.

**Tris-gesättigtes Phenol**

Die Lösung wurde gebrauchsfertig von der Firma Roth bezogen.

**Tris-Glycin-Puffer**

Dieser Puffer enthielt 0,05 M Tris in aqua bidest. Der pH-Wert wurde mit Glycin auf 9,0 eingestellt.

**Triton X-100**

1 ml Triton X-100 wurde in 99 ml aqua bidest gelöst. Dies wurde benutzt, um die Zellen zum Nachweis der Chemotaxis zu lysieren.

**Waschpuffer 1**

Dieser Puffer unterschied sich vom Bindungspuffer nur durch die Konzentration an Imidazol, die 40 mM betrug. Die Herstellung erfolgte wie beim Bindungspuffer beschrieben.

**Waschpuffer 2**

Dieser Waschpuffer unterschied sich vom Waschpuffer 1 nur durch die Imimidazol-konzentration. Diese betrug hier 60 mM.

## 2.7 Zytokine

### **GM-CSF**

GM-CSF wurde von der Firma PeproTech bezogen. Die Konzentration betrug 10 µg/ml. GM-CSF wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### **Interleukin-4 (IL-4)**

IL-4 wurde von der Firma PeproTech bezogen. Die Konzentration betrug 10 µg/ml. IL-4 wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### **Interleukin-16 (IL-16)**

Das IL-16 wurde aus transfizierten *E.coli*-Bakterien des Stamms DE3PL21 gewonnen. Die Konzentration betrug 0,5 mg /ml. Das IL-16 wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### **TNF-α**

TNF-α wurde von der Firma PeproTech bezogen. Es wurde in PBS gelöst und hatte eine Konzentration von 20 µg/ml. TNF-α wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

## 2.8 Antikörper

### 2.8.1 Antikörper für die DC-Behandlung

#### **Anti-TNF-α Antikörper**

Der TNF-α Antikörper (Klon:1825.121) wurde von der Firma R&D bezogen. Er wurde in PBS gelöst, hatte eine Konzentration von 500mg/ml und wurde aliquotiert bei -20°C gelagert.

### 2.8.2 Antikörper für die Durchflußzytometrie

#### **Primäre Antikörper**

#### **Isotypenkontrolle IgG1 und IgG2b**

Es wurden Immunglobuline des Isotyps IgG1 sowie IgG2b aus einer Mausmyelomazelllinie von unbekannter Spezifität von der Firma PharMingen benutzt. Die Konzentration betrug 0,5 mg/ml.

Die folgenden monoklonalen Maus Antikörper wurden von der Firma PharMingen bezogen und hatten eine Konzentration von 0,5 mg/ml.

**Anti-CD1a Antikörper**

**Anti-CD14 Antikörper**

**Anti-CD25 Antikörper**

**Anti-CD40 Antikörper**

**Anti-CD54 Antikörper**

**Anti-CD86 Antikörper**

**Anti-HLA-DR Antikörper**

**Anti-CD83 Antikörper**

Dieser monoklonale Maus Antikörper wurde von der Firma Immunotech (Coulter) bezogen. Er hatte eine Konzentration von 0,2mg/ml.

### **Sekundärer Antikörper**

**Markierter Antikörper**

Hierbei handelte es sich um einen FITC-markierten Ziege anti-Maus Antikörper (IgG + IgM) der Firma Jackson.

## **2.9 Isotope**

### **<sup>3</sup>H-Thymidin Lösung**

Dieses Isotop wurde von der Firma Amersham Pharmacia bezogen und auf 3,7 Mbq/ml eingestellt.

### **[ $\alpha^{32}$ P] UTP**

Das radioaktive UTP wurde von der Firma Amersham bezogen. Die Ausgangskonzentration betrug 0,78 Mbq/ml.

## 2.10 Herstellung von rekombinantem Interleukin-16 (IL-16)

### 2.10.1 Anzucht und Stimulation der Bakterien

Die tiefgefrorenen *E.coli* Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Zwei 50 ml Kolben mit LB-Medium wurden mit jeweils 50 µl Ampicillin versetzt und mit 50 µl der *E.coli* Bakterien angeimpft. Die Kolben wurden ca. 4 Stunden bei 37°C und 180 Upm auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte (OD) bei 590 nm bestimmt. Erreichte die OD einen Wert größer als 0,5, so wurde die Inkubation beendet und die Bakteriensuspension in zwei 50 ml Zentrifugenbecher (Falcon) gefüllt und diese über Nacht bei 4°C gelagert. Am nächsten Morgen wurde der Überstand aus den Zentrifugenbechern bis auf 10 ml entnommen. Die Bakterien wurden aufgewirbelt. Anschließend wurden zwei 1 l Kolben mit LB-Medium mit diesen Bakterien angeimpft und für ca. 3 Stunden bei 37°C und 180 Upm bis zum Erreichen einer OD von 0,5 inkubiert. Anschließend wurden von dieser Bakteriensuspension 2 ml als Probe A (=unstimulierte Proteine) abgenommen. Die Kolben wurden nun mit jeweils 1 ml 1 M Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) versetzt und für 2 Stunden unter den gleichen Bedingungen inkubiert.

### 2.10.2 Isolierung von IL-16 aus *E.coli*

Nach Stimulation der Bakterien mit IPTG wurde die Bakteriensuspension 10 Minuten bei 4500 Upm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet, welches die Bakterien enthielt, in 40 ml Bindungspuffer + 200 µl Aprotinin (5-10 Trypsininhibitor Units/ml) + 200 µl PMSF (100 mM) resuspendiert. Diese Suspension wurde auf zwei 30 ml Zentrifugenröhrchen verteilt und jeweils zweimal 45 sec mit Ultraschall behandelt, um die Zellen aufzuschließen. Es wurde eine Probe B (=stimulierte Proteine) abgenommen. Danach wurden die Röhrchen 15 Minuten bei 20.000 Upm und 4°C zentrifugiert, um die löslichen Proteine von den unlöslichen Zellbestandteilen zu trennen. Der Überstand mit den löslichen Proteinen, ca. 40 ml, wurde abgenommen und eine Probe C hiervon entnommen.

### 2.10.3 Aufreinigung von IL-16

Um das rekombinante Interleukin-16 von den anderen löslichen *E.coli* Proteinen abzutrennen, wurde der Überstand über eine 5 ml Ni-NTA (engl: nickel-nitrilotriacetic-acid)-Agarose-Säule (Qiagen) gegeben. Die Säule wurde vorher mit 50 ml aqua bidest. und 50 ml Bindungspuffer gewaschen. Der durchgelaufene Überstand wurde in einem Kunststoffröhrchen gesammelt. Anschließend wurden nacheinander 40 ml Bindungspuffer

(Fraktion D), 20 ml Waschpuffer 1 (Fraktion E), 20 ml Waschpuffer 2 (Fraktion F) und 20 ml Elutionspuffer (Fraktion G) über die Säule gegeben und die durchgelaufene Flüssigkeit von jedem Puffer getrennt in einem Kunststoffröhrchen gesammelt. Von jeder Fraktion wurde eine Probe (Probe D-G) entnommen. Die Fraktion G wurde in Dialyseschläuche gefüllt und über Nacht gegen PBS dialysiert. Am nächsten Morgen wurde der PBS-Puffer gewechselt. Nach der Dialyse wurde die Fraktion steril filtriert und bei 4°C gelagert. Außerdem wurde eine kleine Menge, ca. 3 ml, von der dialysierten Probe G bei -20°C gelagert.

#### **2.10.4 Gewinnung der unstimulierten Proteine**

Zur Isolierung der unstimulierten *E.coli* Proteine aus Probe A, mussten die Bakterien lysiert werden. Die Probe wurde 1 Minute bei 1400 Upm zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Pellet in 50 µl Frackelton-Puffer resuspendiert. Danach wurde 5 Minuten auf Eis inkubiert, damit die Zellen lysiert werden und anschließend 1 Minute geschüttelt (Vortex). Diese Lösung wurde zur Proteinbestimmung eingesetzt .

#### **2.10.5 Proteinbestimmung**

Die Proteinkonzentrationen in den Proben wurden modifiziert nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) mit einem BioRad Protein Assay bestimmt.

Zur Proteinbestimmung wurde die Stammlösung (Biorad Protein Assay-Reagenz 5-fach ) frisch 1:5 mit aqua bidest. verdünnt und je 1 ml in einem Eppendorfgefäß vorgelegt. Anschließend wurden 1-10 µl der Proben dazupipettiert und gut gemischt. Als Blindwerte wurden jeweils die gleichen Mengen der jeweiligen Probenpuffer verwendet wie bei den einzelnen Proben und ebenfalls mit der verdünnten Bradford-Lösung versetzt. Die Ansätze wurden 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion jeder Probe wurde bei 595 nm gegen ihren Blindwert in Kunststoffküvetten im Photometer gemessen. Der Proteingehalt konnte mit Hilfe einer ebenfalls hergestellten BSA (Bovines Serumalbumin)-Eichreihe von 50-1000 µg/ml ermittelt werden.

#### **2.10.6 Gelelektrophorese (SDS-Page)**

Bei dieser Methode werden Proteine in Polyacrylamid-Gelen nach ihrer molaren Masse unter denaturierenden Bedingungen mit Natriumdodecylsulfat (SDS) eindimensional elektrophoretisch aufgetrennt (Laemmli, 1970). Zunächst werden die Proteine in einem 3%-igen Sammelgel konzentriert, anschließend erfolgt die Auftrennung in einem 12%-igen Trenngel.

### **2.10.6.1 Vorbereitung der Proben für das SDS-Gel**

Die einzelnen Proben wurden nach der Proteinbestimmung mit aqua bidest. angeglichen, so dass 4 µg Protein in 16 µl Lösung vorhanden waren, 4 µl 5-fach Probenpuffer zugegeben und 5 Minuten bei 95°C im Heizblock erhitzt und kurz abzentrifugiert. Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

### **2.10.6.2 Herstellung und Lauf des SDS-Gels**

Zur Auftrennung der Proteine wurde ein 0,75 mm dickes SDS-Gel hergestellt, das aus einem Trenngel (12% Acrylamid) und einem Sammelgel (3% Acrylamid) bestand. Zwei Glasplatten mit 0,75 mm dicken Abstandhaltern wurden mit einem Gummi abgedichtet, in einen Polymerisationsständer gespannt und das Trenngel eingefüllt. Das Trenngel bestand aus 4 ml Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung, 2,5 ml 4-fach Trennpuffer, 3,5 ml aqua bidest., 100 µl Ammoniumpersulfatlösung (APS) und 10 µl TEMED, wobei APS und TEMED die Polymerisation starteten. Das Trenngel wurde mit 0,2% SDS-Lösung überschichtet und ca. 30 Minuten polymerisiert. Dann wurde das SDS mit aqua bidest. abgespült und das Wasser anschließend gründlich entfernt. Nun wurde das Sammelgel eingegossen, ein Taschenformer eingesteckt und das Sammelgel ca. 30 Minuten polymerisiert. Es bestand aus 0,5 ml Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung, 1,25 ml 4-fach Sammelgelpuffer, 3,25 ml aqua bidest., 50 µl APS und 5 µl TEMED. Der Taschenformer sowie die Gummidichtung wurden entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer gesetzt. Diese wurde mit Laufpuffer befüllt und die Luftblasen am Gel entfernt. Anschließend wurden die Taschen mit Laufpuffer gespült und die Proben eingefüllt. Jede der 20 µl Proben enthielt 4 µg Protein und wurde vor dem Auftragen fünf Minuten bei 95°C erhitzt. 5µl Proteinmarker (Biorad) wurden ebenfalls erhitzt und aufgetragen. Die Elektrophorese, bei der die negativ geladenen Proteine zur Anode wandern, wurde mit 10 mA gestartet, bis die Lauffront das Trenngel erreichte. Nach Eintritt der Proben in das Trenngel wurde die Stromstärke auf 20 mA erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, nachdem das in den Proben vorhandene Bromphenolblau unten aus dem Gel herausgelaufen war. Das Gel wurde aus der Kammer herausgenommen und das Sammelgel entfernt. Anschließend wurde das Gel gefärbt.

### **2.10.7 Native Gelelektrophorese**

Bei dieser Methode werden die Proteine nicht denaturiert, sondern verbleiben in ihrer nativen dreidimensionalen Form, d.h. die Proteine werden nach Größe und Ladung getrennt. Auf diese Weise kann geklärt werden, ob ein isoliertes Protein in verschiedenen



Formen vorliegt. Es kann eine Auftrennung in die monomere-, dimere- und tetramere Form erfolgen.

#### **2.10.7.1 Probenvorbereitung für das native Gel**

Es wurden 4µl Proteinprobe, 4µl Tris-Glycin-Puffer und 2µl nativer Probenpuffer gemischt und vor dem Auftragen abzentrifugiert

#### **2.10.7.2 Herstellung und Lauf des nativen Gels**

Die Herstellung des nativen Gels erfolgte wie unter 2.9.7 für das SDS Gel beschrieben. Für das native Gel wird ausschließlich ein Trenngel (9% Acrylamid) gegossen. Es besteht aus 12,5 ml 9%-iger Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung in Tris-Glycin Puffer, 62,5 µl APS und 6,25 µl TEMED. Nach dem Auspolymerisieren ein Gelvorlauf bei 20mA für 20 Minuten durchgeführt, damit APS und TEMED aus dem Gel entfernt werden. Die weitere Durchführung erfolgte wie unter 2.9.7 beschrieben.

#### **2.10.8 Färben der Proteinbanden**

Das Gel wurde nach der Elektrophorese für eine Stunde in eine Coomassie-Lösung gelegt. In dieser Lösung erfolgt die Fixierung und Färbung der Proteinbanden. Anschließend wurde das Gel solange in die Entfärbelösung gelegt, bis der unspezifisch blau angefärbte Hintergrund entfärbt war. Als nur noch die Proteinbanden blau gefärbt waren, wurde das Gel fotografiert und das Bild auf einer Diskette gespeichert. Anschließend wurde das Gel auf einem Filterpapier (Schleicher und Schuell) in einem Geltrockner getrocknet.

#### **2.10.9 LPS-Bestimmung in der IL-16 Präparation**

Da eine Kontamination des aufgereinigten IL-16 mit LPS unter normalen Bedingungen nicht vollständig zu verhindern war, musste die genaue Menge LPS, die sich in der IL-16 Präparation befand, bestimmt werden. Hierzu wurde ein käuflicher LPS Test der Firma Sigma verwendet. Bei dem E-TOXATE Test von Sigma handelte es sich um eine semiquantitative Bestimmungsmethode mittels eines Limulus Amoebocytes Lysate, welches bei Inkubation mit LPS bei 37°C agglutinierte. Die Menge des LPS wurde semiquantitativ mit Hilfe eines im Kit enthaltenen Standards bestimmt.

## **2.11 Präparation der Zellen**

### **2.11.1 Isolation der mononuklearen Leukozyten mit Ficoll**

Der Buffy-Coat wurde mit 50 ml kaltem PBS verdünnt und vorsichtig auf vier mit je 15 ml Ficoll gefüllte 50 ml Zentrifugenbecher (Falcon) verteilt. Dabei wurde das Ficoll mit dem Blut-PBS-Gemisch überschichtet und dann 20 Minuten bei 2000 Upm zentrifugiert. Erythrozyten und Granulozyten sanken dabei unter die Ficoll-Phase und wurden so von den mononukleären Leukozyten, d.h. den Monozyten, Lymphozyten und NK-Zellen, die sich in einer dünnen weißen Bande über dem Ficoll befanden (= Interphase), getrennt. Die Interphase wurde abgenommen, auf zwei 50 ml Zentrifugenbecher verteilt, mit kaltem PBS auf 50ml aufgefüllt und 10 Minuten bei 1200 Upm zentrifugiert. Die Zellen wurden in kaltem PBS + 2% FCS suspendiert und 10 Minuten bei 1000 Upm zentrifugiert. Für die Elutriation wurden die Zellen in 5 ml kaltem PBS + 10% FCS aufgenommen und in eine sterile 5 ml Spritze für die anschließende Elutriation aufgezogen. Durch die Elutriation wurden mehrere Zellfraktionen gewonnen (siehe 2.11). Die Zellfraktion mit den reinen Monozyten wurde benutzt.

## **2.12 Elutriation**

### **2.12.1 Versuchsaufbau**

Der Versuchsaufbau während der Elutriation ist in Abbildung 1 dargestellt.

Ein Pufferstrom wurde mit Hilfe einer Pumpe von einem Vorratsgefäß durch die Elutriationskammer zu einem Auffanggefäß transportiert. Der Pufferstrom passierte dabei zunächst ein Druckmessgerät, das den vorhandenen Druck im System anzeigte, danach die Probenkammer und anschließend den Elutriationsrotor. Ein Dreiwegehahn ermöglichte es, den Pufferstrom an der Probenkammer vorbeizuleiten. Die Zellsuspension wurde mit Hilfe einer Spritze direkt durch einen Gummistöpsel in die Probenkammer eingespritzt (Abb.1). Bei dem verwendeten Rotor handelte es sich um den JE-6B-Elutriationsrotor der Firma Beckman. Wichtige Bestandteile des Elutriationsrotors waren die Trennkammer und deren Gegengewicht, die Bypasskammer; außerdem der Rotorschacht, über den die Flüssigkeit in und aus der Elutriationskammer floss, sowie die rotierende Dichtung, die den beweglichen mit dem stationären Teil des Rotors verband und so einen Flüssigkeitsfluss durch den Rotor ermöglichte, während dieser sich drehte. Bei der Trennkammer handelte es sich um eine Standardelutriationskammer mit einer Füllmenge von 4,2 ml.

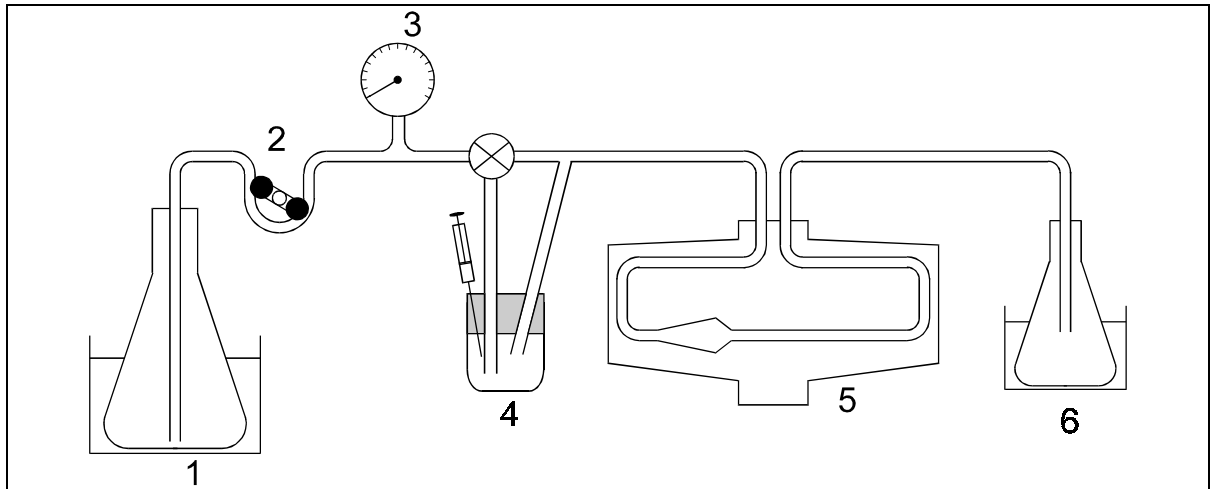


Abb.1: Versuchsaufbau des Elutriationssystems

1: Puffervorratsgefäß

3: Druckmessgerät

5: Rotor

2: Pumpe

4: Probenkammer

6: Sammelbehälter

### 2.12.2 Prinzip der Zelltrennung bei der Elutriation

Die Separation der Zellen im Elutriationsrotor beruht auf dem Prinzip der Gegenstromzentrifugation.

Die im Puffer suspendierten Zellen werden in die Trennkammer geleitet und unterliegen dort zwei entgegengesetzt wirkenden Kräften. Die Zentrifugalkraft wirkt auf die in Lösung befindlichen Zellen und ist abhängig von der Rotordrehzahl. Die Zellen sedimentieren nun abhängig von Größe und Dichte schneller oder langsamer zum zentrifugalen Ende der Trennkammer hin. Dabei sedimentieren kleine und weniger dichte Zellen langsamer als große und dichte Zellen. Entgegengesetzt dieser Zentrifugalkraft wirkt der zentrifugal gerichtete Flüssigkeitsstrom durch die Trennkammer. Durch ihn werden nun die Zellen zum zentrifugalen Ende der Trennkammer transportiert, so dass kleinere und weniger dichte Zellen aus der Kammer herausgespült werden, während größere oder dichtere Zellen in der Trennkammer verbleiben.

Durch die so geschaffenen Bedingungen verteilen sich die Zellen in der Kammer so, dass sich kleinere weniger dichte Zellen am zentrifugalen Ende der Kammer befinden, während sich die größeren und dichteren Zellen weiter am zentrifugalen Ende der Kammer befinden, wenn Sedimentations- und Gegenstromkräfte im Gleichgewicht stehen. Um die Zellen aus der Trennkammer herauszuspülen kann nun eine der beiden angreifenden Kräfte verändert werden. Die Rotationsgeschwindigkeit kann verringert oder die Pufferdurchlaufgeschwindigkeit erhöht werden. Die Änderung der Rotationsgeschwindigkeit ist bei diesem Versuchsaufbau vorzuziehen, da sie sich problemloser und genauer durchführen lässt (Lindahl 1948, Mc Ewen et al. 1968, Grabske 1978, Sanderson et al. 1976).

### 2.12.3 Durchführung der Elutriation

Das gesamte Schlauchsystem mit der Probenkammer wurde vor Beginn der Elutriation mit ca. 300 ml 70% Ethanol gespült, um es zu sterilisieren. Der Durchfluss betrug dabei 18 ml/min und der Rotor lief mit 500 Upm bei einer Temperatur von 4°C. Durch mehrere kurze Druckerhöhungen im System, wobei einer der Schläuche hinter dem Druckmeßgerät kurzfristig mit der Hand zugeedrückt wurde, konnten die Luftblasen aus dem System entfernt werden. Danach wurde das Schlauchsystem unter den gleichen Bedingungen mit ca. 300 ml 4°C kaltem PBS + 2% FCS gespült. Diese Pufferlösung wurde nun während der folgenden Elutriation benutzt. Die Durchflussgeschwindigkeit sowie die Rotortemperatur wurden nicht verändert.

Nachdem das System ausreichend gespült und luftblasenfrei war, konnte die Zellsuspension in die Probenkammer eingespritzt werden. Dabei musste der Dreiwegehahn vor der Probenkammer so eingestellt werden, dass der Pufferstrom nicht durch diese fließen konnte, sondern an der Probenkammer vorbeigeleitet wurde. Die Rotationsgeschwindigkeit der Zentrifuge wurde auf 3200 Upm (Fraktion 1) eingestellt. Danach wurde durch Umstellung des Dreiwegehahns der Pufferstrom durch die Probenkammer geleitet, um dadurch die Zellen in die Trennkammer zu transportieren. Bei dieser Rotorgeschwindigkeit wurden 500 ml Puffer durch das System geschickt und in einem sterilen Erlenmeyerkolben gesammelt. Danach wurde die Rotationsgeschwindigkeit schrittweise auf 2700 (Fraktion 2), 2400 (Fraktion 3), 2150 (Fraktion 4) und 1900 Upm (Fraktion 5) gesenkt und von jeder Fraktion 200-300 ml getrennt gesammelt. Die Kolben wurden bis zur Bestimmung der Zellzusammensetzung und weiteren Bearbeitung auf Eis gestellt.

### 2.12.4 Bestimmung der Zellzusammensetzung der Elutriationsfraktionen

Die durch die Elutriation gewonnen fünf Zellfraktionen wurden mit Hilfe des FACScan auf ihre Zellzusammensetzung hin untersucht. Dazu wurde jeweils 1 ml von jeder Fraktion abgenommen und direkt im FACScan analysiert.

Gemessen wurden mit diesem Gerät die Größe und die Granularität der Zellen. Die Messung der Zellgröße (= Forward Scatter) erfolgte über eine Photodiode in Verlängerung des Strahlenganges, die das in Vorwärtsrichtung gestreute Licht maß. Die Granularität (SSC = Side Scatter) wurde durch einen Lichtimpulsverstärker bestimmt, der das seitlich abgegebene Streulicht maß. Größe und Granularität einer Zelle wurden als Punkt in einem zweidimensionalen Koordinatensystem auf dem angeschlossenen Bildschirm dargestellt. Dabei war auf der x-Achse die Größe und auf der y-Achse die Granularität der Zelle aufgetragen.

### **2.13 Stimulierung der Monozyten mit IL-16**

Zellkulturschalen (Falcon) wurde mit 1 ml FCS beschichtet und für 2-3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das FCS wieder abgenommen.

Die Monozytenfraktion nach der Elutriation (Fraktion 5 bei 1900 Upm) wurde in 50 ml Zentrifugenbecher abgefüllt und 10 min bei 1000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 37°C warmem RPMI 1620 + 10% FCS aufgenommen und die Zellzahl auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt.

In die vorbereiteten Zellkulturschalen wurden je 10 ml Zellsuspension pipettiert. In einer Schale wurden die Monozyten nicht stimuliert und dienten als Negativkontrolle und in einer zweiten wurden die Monozyten mit 1µg/ml IL-16 stimuliert. Die Zellkulturschalen wurden nun bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im feuchten Brutschrank inkubiert. Nach 18 Stunden wurden die Zellen und Überstände für weitere Untersuchungen abgenommen. Die Überstände wurden aliquotiert und bei - 20°C eingefroren..

### **2.14 Kultivierung der Monozyten zur Differenzierung zu dendritischen Zellen**

Die Zellzahl der Monozyten wurde auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Jeweils 5 ml dieser Zellsuspension wurde pro Zellkulturschale (Falcon) eingesäht und 50 ng/ml GM-CSF und 1 ng/ml IL-4 zugegeben, um die Differenzierung der Monozyten zu DC zu induzieren. Die Inkubation der Zellen erfolgte im feuchten Brutschrank bei 37°C und 6% CO<sub>2</sub> für 7 Tage.

### **2.15 Stimulierung der DC mit IL-16**

DC wurden an Tag 7 der Kultur mit IL-16 (1µg/ml) stimuliert. Die Zellkulturschalen wurden nun bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im feuchten Brutschrank inkubiert. Nach 18 Stunden wurden die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber von der Schalenboden geschabt und durch pipettieren im Medium aufgewibelt. Die Zellsuspension wurde in ein Bluecap überführt und 10 min bei 1000 Upm zentrifugiert. Die Überstände wurden für weitere Untersuchungen abgenommen und aliquotiert bei - 20°C eingefroren.. Die Zellen wurden je nach Weiterbehandlung in verschiedenen Medien oder Puffern aufgenommen.

## **2.16 Chemotaxis**

### **2.16.1 Prinzip der Chemotaxis**

Mit Chemotaxis wird die direkte Bewegung von Organismen z.B. Zellen hin zu einer Quelle mit einem chemotaktisch wirkenden Stoff bezeichnet. Chemotaxis wurde erstmalig bei Farnkrautpollen vor 100 Jahren von Pfeffer beschrieben.

Bei eukaryontischen Zellen sind vor allem die Leukozyten des Bluts geeignete Studienobjekte. Einige Stoffe wie z.B. FMLP wirken chemotaktisch auf Lymphozyten oder Monozyten, d.h. die Zellen können sich aktiv in Richtung dieses Stoffes bewegen. Diese Bewegung erfolgt entlang eines Konzentrationsgradienten hin zur höheren Konzentration des Stoffes.

Zur Messung dieser Zellbewegung entwickelte Boyden eine Kammer, in der die Zellen in der oberen Hälfte der Kammer mit Hilfe einer Membran von dem chemotaktisch wirkenden Stoff in der unteren Hälfte getrennt werden. Die Membran muss eine bestimmte Porengröße besitzen, die verhindert, dass die Zellen durch Diffusion in die untere Kammer gelangen können, jedoch eine aktive Wanderung der Zellen in oder durch die Membran zulässt.

### **2.16.2 Aufbereitung der frischen Monozyten**

Die Monozyten wurden wie unter 2.12.3 beschrieben, durch Elutriation gewonnen. Die Monozyten der Elutriationsfraktion 6 wurden hier in PBS +Ca<sup>2+</sup> +Mg<sup>2+</sup> + 0,1% BSA aufgenommen und die Zellzahl auf 1x10<sup>6</sup> Zellen/ ml eingestellt.

### **2.16.3 Adhärenz der Monozyten für die Chemotaxis**

Die Monozyten wurden nach der Elutriation in 37°C warmem RPMI 1620 Medium aufgenommen und die Zellzahl auf 2x10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt. Jeweils 20 ml der Zellen wurden in Zellkulturschalen (Falcon) pipettiert und eine Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde das Medium mit den nicht adhärenen Zellen abgenommen und 20 ml frisches RPMI 1620 Medium auf die adhärenen Monozyten gegeben. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im feuchten Brutschrank inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Monozyten durch kräftiges pipettieren von der Schale abgelöst und 10 Minuten bei 1000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde in PBS +Ca<sup>2+</sup> +Mg<sup>2+</sup> + 0,1% BSA aufgenommen und die Zellzahl auf 1x10<sup>6</sup> Zellen/ ml eingestellt.

#### 2.16.4 Aufbereitung der DC für die Chemotaxis

DC wurden an Tag 7 der Kultur aus den Zellkulturschalen für die Durchführung der Chemotaxis entnommen. Die Zellen wurden mit einem sterilen Schaber von der Schalenoberfläche geschabt und durch mehrmaliges pipettieren im Medium aufgewirbelt. Diese Zellsuspension wurde in ein Bluecap überführt, die Zellzahl bestimmt und die Zellen 10 Minuten bei 1000 Upm Zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Zellen wurden in PBS +Ca<sup>2+</sup> +Mg<sup>2+</sup> + 0,1% BSA aufgenommen und die Zellzahl auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ ml eingestellt.

#### 2.16.5 Durchführung der Chemotaxis

Für diesen Versuch wurden 200 µl Blind-Well Kammern der Firma Costar verwendet. Diese Kammern besitzen eine Vertiefung (= untere Kammer), in die der Stimulus pipettiert wurde. Darauf wurde der Filter mit der glänzenden Seite nach unten luftblasenfrei gelegt und anschließend ein Deckel aufgeschraubt. Der Deckel war durchbohrt. Die Bohrung bildete zusammen mit der Membran die obere Kammer. In diese Kammer wurden die Zellen hineinpipettiert und hatten so Kontakt mit dem Filter.

Vor Versuchsbeginn mussten die Filter vorbereitet werden. Dabei handelte es sich um Polycarbonat Membranen der Firma Costar mit einem Durchmesser von 10 mm und einer Porengröße von 8 µm. Die Filter wurden vorsichtig mit einer feinen anatomischen Pinzette in eine Kulturschale mit 70% Ethanol gegeben. Anschließend wurden die Filter durch zwei weitere Schalen mit aqua bidest. gezogen und auf einer fusselfreien Zellstoffunterlage getrocknet.

In die unteren Kammern wurden unterschiedliche Konzentrationen von IL-16, 10 nM FMLP als Positivkontrolle und Medium als Negativkontrolle pipettiert. Es wurden jeweils ca. 100 µl pro Ansatz pipettiert, so dass ein kleiner "Berg" entstand. Es wurden Dreifach-Bestimmungen durchgeführt. Anschließend wurden die Filter mit der glänzenden Seite nach unten auf die mit Stimulus gefüllte untere Kammer gelegt und der Deckel auf die Kammer geschraubt. In die oberen Kammern wurden 100 µl Zellsuspension hineinpipettiert. Die Kammern wurden nun für zwei Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im feuchten Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen vorsichtig aus der oberen Kammer mit einer Mikropipette abgesaugt, ohne dabei den Filter zu zerstören oder Flüssigkeit aus der unteren Kammer zu entnehmen. Anschließend wurde der Deckel abgeschraubt und evtl. vorhandene Restflüssigkeit um den Filter herum abgesaugt. Der Filter wurde vorsichtig über die Kante der Vertiefung abgezogen. Die Zellen jedes Ansatzes, die in die unteren Kammern gewandert waren, wurden nun einzeln in die wells einer beschrifteten 96 well Mikrotiterplatte pipettiert. Eine vorbereitete Eichreihe und Medium als Blindwert wurden als Doppelbestimmung ebenfalls in die Platte pipettiert. In

jedes well wurden 100 µl pipettiert. Zu diesen 100 µl Zellen wurden 10 µl Triton-X 100 gegeben und anschließend 100 µl Substrat überall dazupipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde im feuchten Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Reaktion mit 100 µl Chemotaxis-Stop-Puffer abgestoppt. Die Platte wurde anschließend in einen ELISA-TWINREADER gestellt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Zur Auswertung des Versuchs wurde der chemotaktische Index jeder Probe bestimmt.

### **2.17 Zellanalyse im FACScan™**

Mit Hilfe der FACS-Färbung kann man Zelloberflächenmarker mit spezifischen Antikörpern markieren. Durch einen an den Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff kann dies mit Hilfe der Fluoreszenzmessung im FACScan nachgewiesen werden. Je höher die Fluoreszenzintensität einer Zelle ist, desto mehr des betreffenden Antigens ist auf der Oberfläche vorhanden.

In diesem Versuch wurde eine indirekte Färbung durchgeführt. Der erste Antikörper (Maus-anti-human-Protein) erkannte spezifisch ein Antigen (z.B. CD25) auf der Zellmembran, während der zweite Antikörper (Ziege-anti-Maus IgG) mit dem Fluoreszenzfarbstoff (FITC) markiert war und an den ersten Antikörper band.

Humane Monozyten sowie DC wurden wie unter 2.112 und 2.14 beschrieben mit rIL-16 stimuliert. Unstimulierte Monozyten bzw. DC dienten als Negativkontrolle. Die einzelnen Ansätze wurden auf die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle auf der Membran der Zellen untersucht. Dabei wurden pro zu testendem Antikörper  $2 \times 10^5$  Zellen in ein 600 µl-Polystyrol-Röhrchen (Greiner, Nürtingen) pipettiert. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 1500 Upm abzentrifugiert, zweimal mit FACS-Waschpuffer gewaschen und in 50 µl FACS-Waschpuffer aufgenommen. Nun wurden 5 µl der jeweiligen ersten Antikörper (unspezifischer IgG1=Simultest, CD1a, CD4, CD14, CD25, CD40, CD54, CD80, CD86 und anti HLA-DR) auf die Zellen gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit FACS-Waschpuffer gewaschen und die Zellen wurden mit 20 µl 1:100 in FACS-Waschpuffer verdünnten, FITC-markierten Ziege-anti-Maus-Antikörper (IgG) versetzt und 30 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Danach wurde zweimal gewaschen, die Zellen in jeweils 300 µl FACS-Waschpuffer aufgenommen und die Fluoreszenz im FACScan bestimmt.



## 2.18 Analyse der Genexpression in Monozyten und DC

### 2.18.1 RNA-Isolierung aus Zellen

Zur RNA-Gewinnung wurden  $5 \times 10^6$  bis  $2 \times 10^7$  Zellen in 900  $\mu$ l GTC-Lösung aufgenommen und in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dies wurde bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert oder sofort aufgearbeitet. Hierzu wurden 90  $\mu$ l 2 M Natriumacetat (pH 4) als Fällungshilfe zugegeben und kurz geschüttelt. Dann wurden 900  $\mu$ l saures Phenol zugegeben und mit Hilfe des Vortex Schüttlers gemischt. Es erfolgte die Zugabe von 170  $\mu$ l Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) und 10-20 s Mischen des Ansatzes auf dem Laborschüttler. Danach wurde der Ansatz für 15 min auf Eis gestellt und dann 20 min bei 14.000 Upm und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der wässrige Überstand wird in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml Isopropanol versetzt und die RNA über Nacht bei  $-20^\circ\text{C}$  gefällt. Am nächsten Tag wurde der Ansatz 20 min bei 14.000 Upm und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit 70% und einmal mit 100% Ethanol gewaschen, getrocknet und je nach Größe des Pellets in 20-50  $\mu$ l  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen. Danach erfolgte eine Konzentrationsbestimmung.

### 2.18.2 Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentration wurde photometrisch über die Bestimmung der OD bei 260 nm ermittelt.

RNA-Konzentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) = OD (260nm) x Verdünnungsfaktor x 40

### 2.18.3 RNase Protection Assay (RPA) RiboQuant™

Der RNase Protection Assay ist eine sehr sensitive und spezifische Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung von mRNA. Mit dem RiboQuant™ System der Firma PharMingen konnte in einem Versuchsansatz die Expression von bis zu 8 Genen gleichzeitig untersucht werden. Außerdem wurde als interner Standard die Expression der beiden Housekeeping Gene GAPDH und L 32 bestimmt. In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Zytokin- und Chemokin-Sets gewählt. Das RiboQuant System enthielt Templates, die mit  $^{32}\text{P}$ -UTP radioaktiv markiert und mit der zu untersuchenden RNA hybridisiert wurden. Mit einem Gemisch zweier RNasen wurden alle einzelsträngigen RNA-Moleküle abgebaut. Es blieben also nur die vor dem RNase-Verdau geschützten doppelsträngigen mRNA-Moleküle der zu untersuchenden Zytokine und 2 Housekeeping Gene unverdaut. Diese konnten dann in einem Polyacrylamid Gel getrennt und durch Autoradiographie auf einem Film sichtbar gemacht werden. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit Hilfe eines Instant Imagers. Die genaue Versuchsbeschreibung kann

dem Handbuch der Firma PharMingen entnommen werden [RiboQuant™, Instuction Manual, 1999].

## 2.19 ELISA

Zur Bestimmung der Konzentration verschiedener Zytokine und Chemokine in den Überständen von Monozyten und DC wurden käufliche ELISA-Kits der Firma BeckmanCoulter (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , MCP-1 und RANTES) sowie R&D Systems (MIP-1 $\alpha$ , MIP- $\beta$ ) verwendet. Die genaue Versuchsbeschreibung kann dem Handbuch des jeweiligen Kits entnommen werden.

## 2.20 Proliferationstest (MLR: mixed lymphocyte reaction)

Der Proliferationstest wurde in 96-Well Rundbodenplatten durchgeführt und die unter 2.15 behandelten DC auf  $1 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Es wurde RPMI 1640 Medium mit 10% FCS unter Zusatz von 0,5% des Antibiotikums Ciprobay, 100 U/ml Penicillin und 0.1 mg/ml Streptomycin verwendet.

Jede Probe wurde als Dreifachansatz pipettiert. In jedes Well der Platten außer Reihe A wurde zunächst 100  $\mu$ l Medium vorgelegt. Dann wurde in Reihe A jeweils 150 $\mu$ l/well der DC-Suspension pipettiert und anschließend mit einer Mehrkanalpipette gemischt und jeweils 50 $\mu$ l in die nächste Reihe gegeben. Die Verdünnungsreihe wurde bis Reihe G durchgeführt. Reihe H diente als Negativkontrolle.

Die allogenen T-Lymphozyten wurden durch Elutriation gewonnen und bei  $-70^\circ\text{C}$  eingefroren. Sie wurden aufgetaut, 2 mal mit Medium gewaschen und auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. In jedes Well der vorbehandelten Platten wurden 100 $\mu$ l der Zellsuspension pipettiert. Die Platten wurden 5 Tage bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  kultiviert. Nach 24h wurde in drei wells der Kontrollreihe H je 5 $\mu$ l einer PHA-Lösung (40 $\mu$ g/ml) als Positivkontrolle für die Stimulierbarkeit der T-Zellen gegeben. Nach 5 Tagen wurden 10 $\mu$ l  $^3\text{H}$  markiertes Thymidin (37 KBq) pro well zugegeben und die Platten für weitere 24h im Brutschrank inkubiert. Proliferierende T-Zellen bauten in dieser Zeit das  $^3\text{H}$  Thymidin in ihre DNA ein. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zell-Harvesters auf Filter gespült, gewaschen und getrocknet. Anschließend wurde 20 $\mu$ l Szintillisationsflüssigkeit pro well auf die Filter gegeben. Die Messung der Radioaktivität erfolgte im  $\beta$ -Counter.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Herstellung von rekombinantem Interleukin-16

#### 3.1.1 Proteinbestimmung

IL-16 wurde von transfizierten E.coli Bakterien produziert. Die E.coli Bakterien wurden zu Beginn des Versuchs in LB-Medium bis zu einer OD von ungefähr 0,5 inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien mit IPTG zur Synthese von IL-16 stimuliert. Nach zwei Stunden Inkubationszeit wurden die Bakterien lysiert und die löslichen Proteine durch Zentrifugation von den Zelltrümmern abgetrennt. Das IL-16 war ein Fusionsprotein mit einem Polyhistidinrest. Dieser bindet an  $\text{Ni}^{2+}$  und ermöglicht eine Reinigung des Proteins durch Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose. Zur Abtrennung des IL-16 von den anderen E.coli Proteinen wurde der Überstand über eine  $\text{Ni}^{2+}$ -Agarose-Säule gegeben. Die Säule wurde anschließend mit verschiedenen Puffern gespült.

Es wurden nach jedem Aufarbeitungsschritt Proben entnommen, die auf ihren Proteingehalt und IL-16 untersucht wurden. Probe A enthielt Proteine der unstimulierten Bakterien, Probe B enthielt Proteine nach Stimulation der Bakterien mit IPTG, Probe C enthielt die löslichen Proteine nach Lyse der Bakterien und Abzentrifugieren der festen Zelltrümmer. Proben D-G enthielten die einzelnen Fraktionen der Säule. Um die Proteinkonzentration in diesen einzelnen Proben zu bestimmen, wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Es wurden die Proteinkonzentrationen der Proben A-G bestimmt. Die Tabelle 2 zeigt die Proteinkonzentrationen in den einzelnen Proben.

<u>Probe</u>	<u>Proteinkonzentration</u>
A	210 µg/ml
B	490 µg/ml
C	1696 µg/ml
D	1050 µg/ml
E	155 µg/ml
F	206 µg/ml
G	430 µg/ml

Tab. 2: Proteinkonzentrationen in den Proben

Für die weitere Analyse der Proben im SDS-Gel mussten jeweils 4 µg Protein von diesen Proben eingesetzt werden. Die benötigten Mengen in µl konnten nach Bestimmung der Proteinkonzentration berechnet werden. Von den Proben C, D und E wurden die gleichen Mengen eingesetzt wie von Probe B.

### 3.1.2 SDS-Gel

Die Proteinzusammensetzung in den einzelnen Proben A-G wurde in einem SDS-Gel überprüft. Dabei wurden von jeder Probe 20 µl mit einer Proteinmenge von 4 µg aufgetragen. Während der Elektrophorese lief ein Proteingemisch als Molekulargewichtsmarker mit. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurde das Gel zum Sichtbarmachen der Proteinbanden in Coomassie Brilliantblau-Lösung gefärbt und anschließend in Essigsäure entfärbt, so dass nur noch die Proteinbanden blau gefärbt waren. Abb.4 zeigt das Gel mit den gefärbten Proteinbanden.

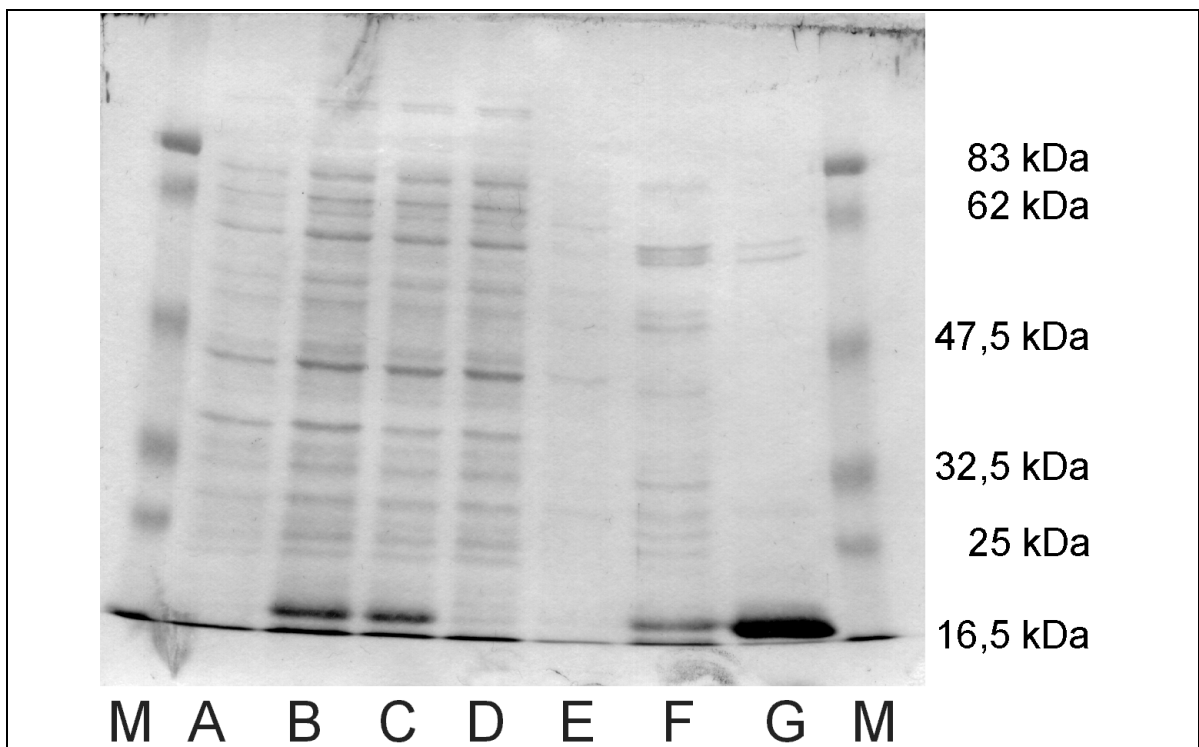


Abb.4: SDS-Gelelektrophorese der einzelnen Fraktionen bei der IL-16 Herstellung. Dargestellt ist die Coomassie gefärbte SDS- Gelelektrophorese der entnommene Proben A-G bei der IL-16 Herstellung sowie des Proteinmarkers (M).

In Probe A waren sehr viele über die gesamte Laufstrecke verteilte Proteinbanden.. Hierbei handelte es sich um die zellulären Proteine der *E.coli* Bakterien. In Probe B war das gleiche Bandenmuster zu erkennen, nur dass hier eine starke Bande bei ca. 17 kDa vorhanden war, die in Probe A nicht nachgewiesen werden konnte. Hierbei handelte es sich vermutlich um

das monomere rekombinante IL-16, da diese Bande erst nach Stimulation der Bakterien mit IPTG auftrat. Da das SDS-Gel denaturierende Eigenschaften besaß, waren auch nur Monomere zu erwarten. Bei Probe C, die die löslichen Bakterienproteine enthielt, war das gleiche Bandenmuster vorhanden wie in Probe B, nur dass die Intensität schwächer war und somit eine geringere Proteinkonzentration in der Probe vorlag. Probe C enthielt die nicht an die Säule gebundenen Proteine. Hier war die 17 kDa Bande nicht zu erkennen, so dass das IL-16 vollständig an die Säule gebunden hatte. Probe E und F waren die Waschpuffer nach Durchlauf durch die Säule mit ansteigender Imidazol Konzentration. Im ersten Waschpuffer (15mM Imidazol) waren ein paar Proteinbanden zu erkennen während der zweite Waschpuffer (20mM Imidazol) auch schon eine geringe Menge IL-16 enthielt. Im Elutionspuffer (Probe G) war nun eine starke IL-16 Bande zu erkennen. Daneben traten keine weiteren Proteinbanden auf, so dass die Aufreinigung über die Säule erfolgreich war.

### 3.1.3 Natives Gel

Das verwendete IL-16 aus der Elutionspufferfraktion wurde in einem nativen Polyacrylamidgel getrennt, um die Zusammensetzung des Proteins zu analysieren. IL-16 kann in drei verschiedenen Formen vorliegen. Zum einen als Monomer, als Dimer und als biologisch aktives Tetramer. In diesem nativen Gel wurden die Proteine im Unterschied zum SDS-Gel nicht denaturiert, so dass es möglich war, die drei Formen des IL-16 voneinander zu trennen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurde das Gel in Coomassie Brilliantblau-Lösung gefärbt und anschließend in Essigsäure entfärbt, so dass nur noch die Proteinbanden blau gefärbt waren. Abbildung 5 zeigt das Gel mit den gefärbten Proteinbanden.

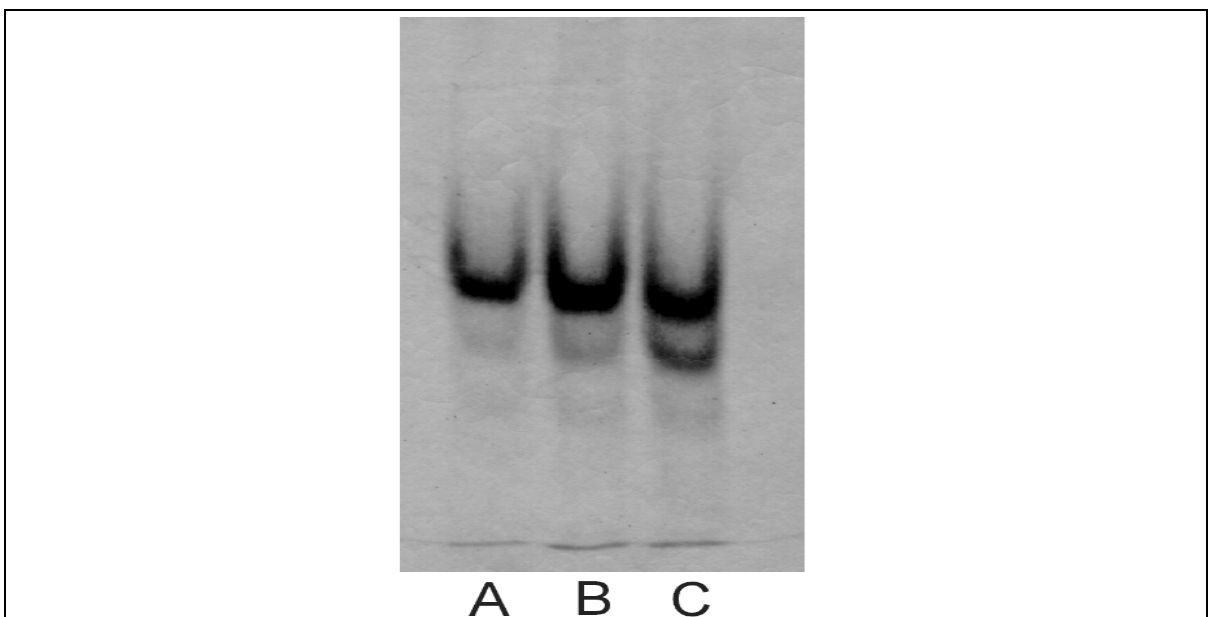


Abb.4: Natives-Gel. Dargestellt ist ein Coomassie gefärbtes natives Gel mit 3 verschiedenen IL-16 Konzentrationen ( A: 0,5 µg, B: 2 µg und C: 8 µg).

IL-16 wurde in drei verschiedenen Konzentrationen auf das Gel aufgetragen. Probe A enthielt 0,5 µg, Probe B 2 µg und Probe C enthielt 8 µg Protein. Bei allen drei Proben waren nach dem Lauf drei Banden zu erkennen. Dabei handelte es sich um die monomere, dimere und tetramere Form von IL-16. Da nur ein kleiner Teil des IL-16 als biologisch aktive Tetramerform vorliegt, muss zur Stimulation von Zellen eine relativ hohe Konzentration von 1µg/ml des Proteins eingesetzt werden.

### 3.1.4 Bestimmung der LPS Konzentration in der IL-16-Lösung

Vor Verwendung des rekombinanten IL-16 zur Stimulation von Monozyten und DC wurde die LPS Konzentration der IL-16-Lösung bestimmt. Dies wurde mit dem Limulus Assay der Firma Sigma durchgeführt. Die Nachweisgrenze für LPS lag bei 7,5 ng/ml. In der verwendeten IL-16-Lösung konnte mit diesem Test kein LPS nachgewiesen werden, d.h. die LPS Konzentration lag unter 7,5 ng/ml und dürfte damit keinen Einfluss auf die Stimulation der Zellen haben.

## 3.2 Zellgewinnung

### 3.2.1 Monozytenaufreinigung

Die Gewinnung der Monozyten erfolgte wie unter 2.10 und 2.11 beschrieben. Ziel der Aufarbeitung war es, möglichst reine Monozyten in großer Menge zu gewinnen. Zur Präparation der Monozyten wurden die Blutzellen durch mehrere Aufarbeitungsschritte (Ficoll und Elutriation) gereinigt.

Während der Aufarbeitung wurde nach jedem Reinigungsschritt die Zusammensetzung des Zellmaterials durch Messung im FACScan bestimmt. Dabei wurden die Zellen nach Größe und Granularität in FACS-Bildern dargestellt und konnten so identifiziert werden.

Die Abbildung 4 zeigt die Zellzusammensetzungen bei den jeweiligen Aufarbeitungsschritten anhand der gewonnenen FACS-Bilder.

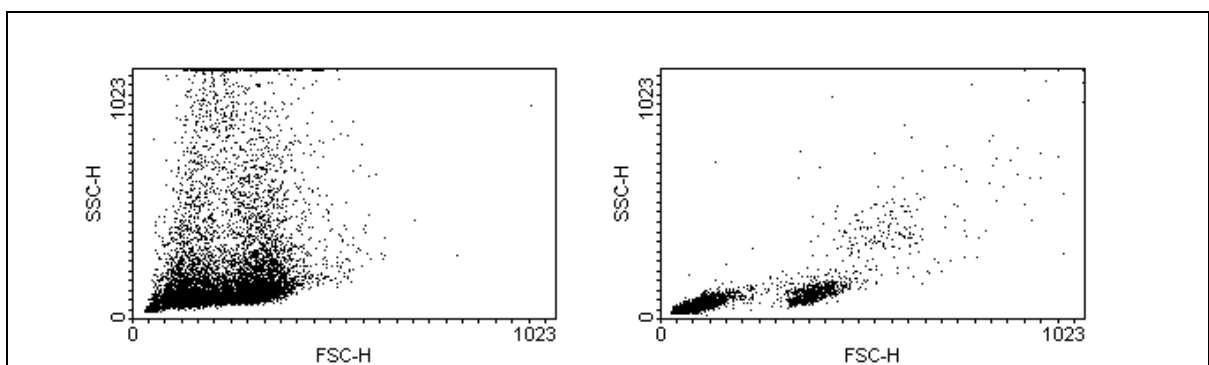


Abb. 4a: Buffy Coat

Abb. 4b: Interphase des Ficoll-Gradienten

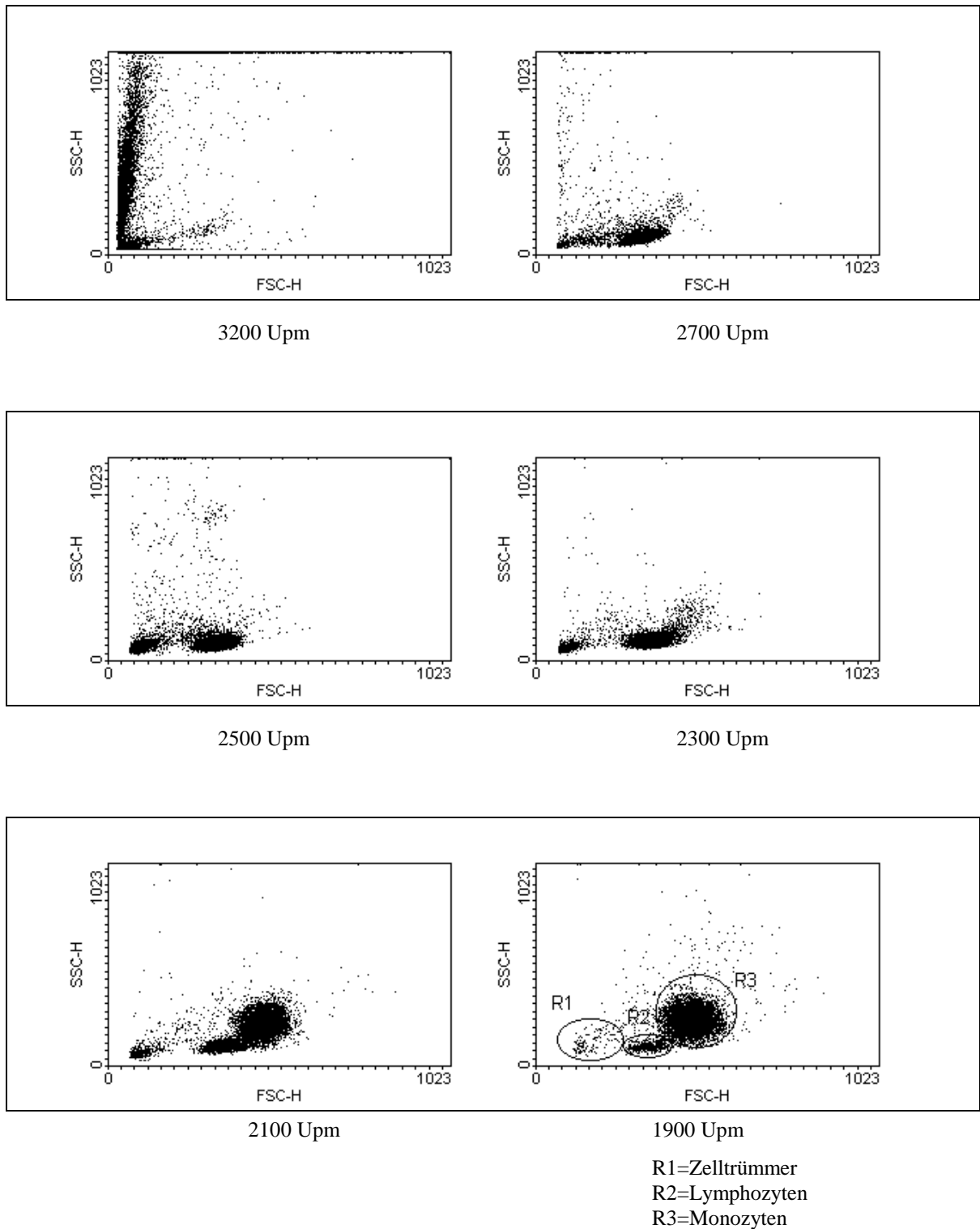


Abb. 4c Fraktionen der Elutriation

Abb.4: Darstellung der Zellzusammensetzung nach FACS-Analyse bei der Buffy-Coat Aufreinigung

Das FACS-Bild der Zellzusammensetzung des Buffy-Coats (Abb.4a) zeigte hauptsächlich Erythrozyten. Durch den Ficoll-Aufreinigungsschritt (Abb.4b) konnten diese größtenteils abgetrennt werden. Das FACS-Bild zeigte kleine Blutbestandteile (u.a.Thrombozyten), Lymphozyten und wenig Monozyten.

Während der Elutriation wurden 6 Fraktionen, die durch schrittweise Verminderung der Rotationsgeschwindigkeiten entstanden sind, gesammelt (Abb.4c).

Die erste Fraktion, die bei 3200 Upm gewonnen wurde, enthielt fast ausschließlich kleine Bestandteile. Die zweite Fraktion (2700 Upm) enthielt ebenfalls kleine Bestandteile, jedoch auch sehr viele Lymphozyten. Der Lymphozytenanteil lag bei ca. 70% (Tab.3). Die bei 2500 Upm und 2300 Upm gewonnenen Fraktionen bestanden zu fast 90% aus Lymphozyten. Die fünfte Fraktion, die bei 2100 Upm gewonnen wurde, setzte sich zu etwa gleichen Teilen aus Monozyten (44%) und Lymphozyten (33%) zusammen und enthielt 15% kleine Bestandteile. In der letzten, bei 1900 Upm gewonnenen Fraktion, lagen die Monozyten relativ rein vor. Diese Fraktion enthielt 94% Monozyten und 5% Lymphozyten. Kleine Bestandteile waren zu etwa 3% in dieser Fraktion vorhanden.

Die folgende Tabelle 3 gibt den prozentualen Anteil der Lymphozyten und Monozyten in den Aufarbeitungsschritten wieder. Die prozentuale Verteilung der Zellen wurde durch das Setzen von Fenstern um die jeweiligen Zellpopulationen im FACS-Bild ermittelt. Die Fenster sind in Abbildung 4c dargestellt.

<u>Aufarbeitungsschritt</u>	<u>Monozyten</u>	<u>Lymphozyten</u>
Ficoll	1%	11%
Elutriation:		
Fraktion 1	0%	2%
Fraktion 2	0,5%	74%
Fraktion 3	1%	91%
Fraktion 4	4%	88%
Fraktion 5	33%	45%
Fraktion 6	94%	5%

Tab.3: Prozentuale Verteilung der Zellen während der Aufarbeitung

Mit den hier gezeigten FACS-Bildern und Daten wurde die typische Zellverteilung während der Aufarbeitung dargestellt.

Durch die Aufarbeitung eines Buffy-Coats konnten aus der bei 1900 Upm gesammelten Fraktion ca.  $1 \times 10^8$  Monozyten gewonnen werden.

### 3.3 Stimulierung von Monozyten

Die Monozyten wurden aus Buffy-Coats isoliert und anschließend stimuliert. Dabei wurden die Monozyten in Zellkulturschalen (Falcon) eingesät. Es wurden pro Schale 10 ml mit einer Zellkonzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen / ml eingesät und die Zellen für 18h mit IL-16 (1µg/ml) oder ohne Zusatz kultiviert.



Die Monozytenüberstände wurden nach der Stimulation bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren und später auf verschiedene Zytokine und Chemokine im ELISA getestet. Ein Teil der Zellen wurde einer FACS-Färbung unterzogen, um die Auswirkungen von IL-16 auf die Expression von CD25 auf der Monozytenmembran aufzuzeigen, während die restlichen Zellen lysiert und für die RNA-Gewinnung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren wurden.

### 3.3.1 Durchflußzytometrie: CD25 Expression bei Monozyten

CD25 ist ein typischer Aktivierungsmarker für T-Lymphozyten und Monozyten. Es ist ein Teil des IL-2R und wird nach Aktivierung des Monozyten auf der Zellmembran verstärkt exprimiert.

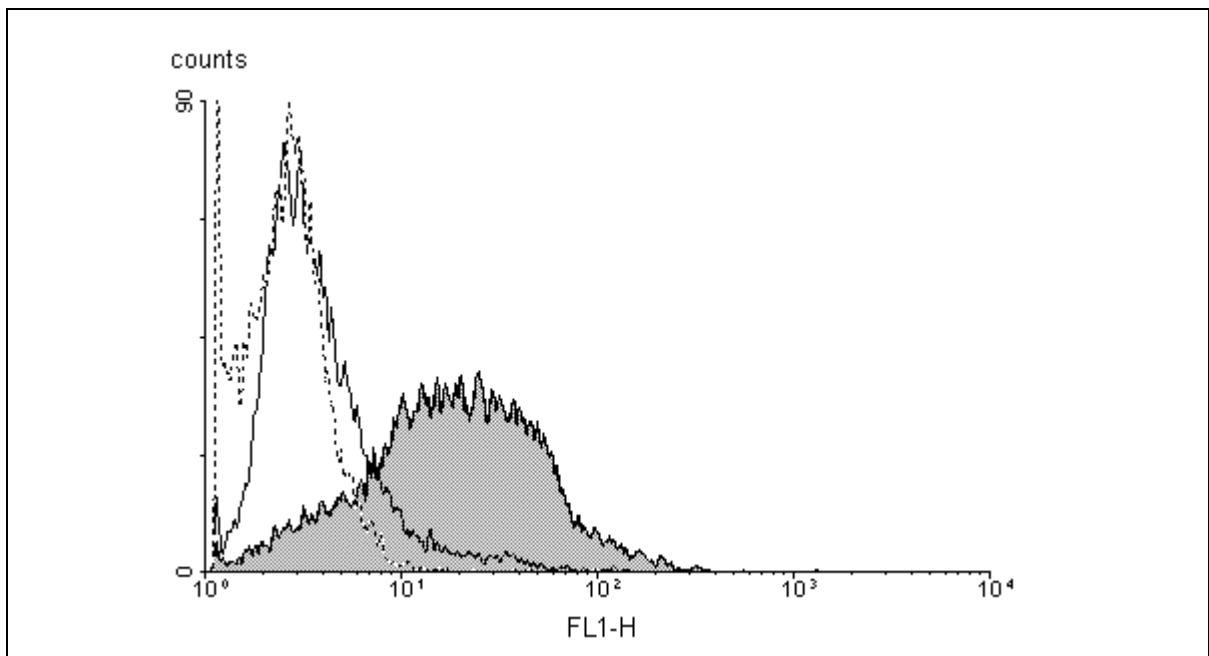


Abb.5: Anstieg der CD25 Expression bei Monozyten nach IL-16 Stimulation. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der Simultestkontrolle (gepunktete Linie), der unstimulierten Monozyten (durchgehende Linie) und IL-16 stimulierter Monozyten (grau ausgefüllte Linie).

Die Abbildung zeigt die Expression von CD25 nach 18 Stunden. Unstimulierte Monozyten exprimierten fast gar kein CD25. Die Kultivierung von Monozyten mit IL-16 führte zu einer deutlichen Erhöhung der CD25 Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

### 3.3.2 Einfluss von IL-16 auf die Expression verschiedener Zytokin- und Chemokingene in Monozyten

Die Monozyten wurden zusätzlich auf die Induktion verschiedener Zytokin- und Chemokingene untersucht. Dafür wurde die RNA aus den Zellen von jeweils 5 Spendern isoliert und ein RNase Protection-Assay der Firma PharMingen durchgeführt. Es wurden zwei verschiedene Kits verwendet. Im ersten wurde die Expression der Zytokine IL-12p35, IL-12p40, IL-10, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-6, IFN- $\gamma$  sowie der beiden Housekeeping Gene L32 und GAPDH bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Instant Imagers.

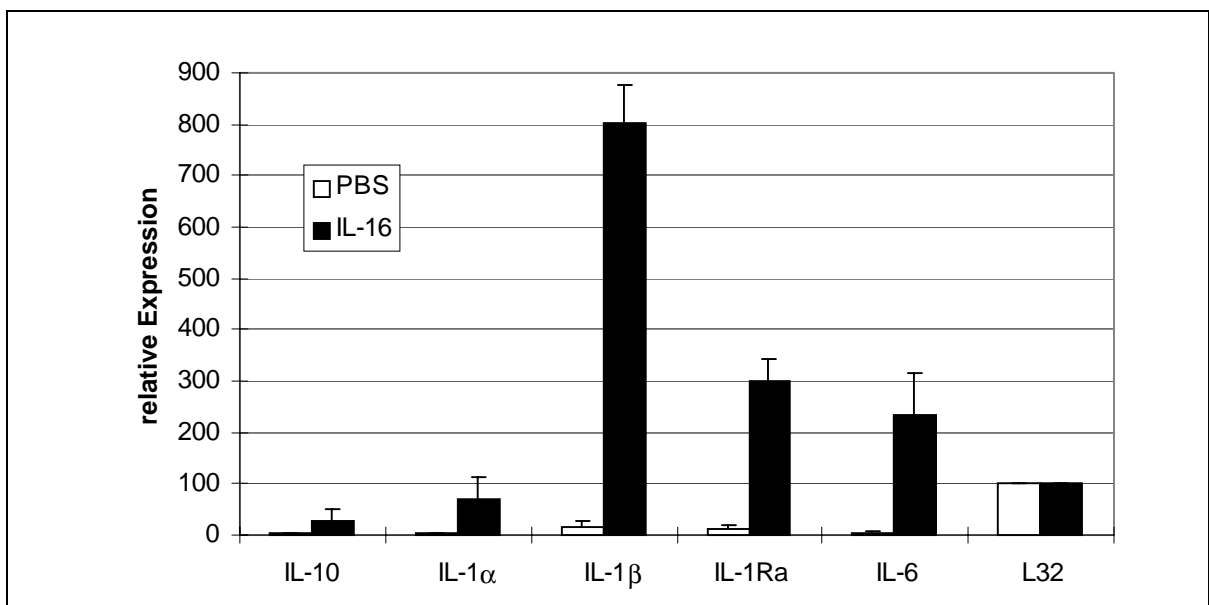


Abb.6: Genexpression von IL-10, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra und IL-6 durch DC. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Zytokinexpression des RPA von 5 Spendern. Die DC wurden für 18h mit IL-16 (1 $\mu$ g/ml) kultiviert. Es wurden 5 $\mu$ g RNA eingesetzt.

In der Abbildung ist zu erkennen, dass in unstimulierten Monozyten nur eine geringe Menge mRNA der Zytokingene IL-10, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra sowie IL-6 vorhanden war. Die Expression dieser Gene war nach Kultivierung der Monozyten mit IL-16 deutlich erhöht. Es konnte die fünffache Menge mRNA von IL-1Ra und IL-6 im Vergleich zu IL-10 und IL-1 $\alpha$  nachgewiesen werden. IL-1 $\beta$  wurde am höchsten exprimiert. IL-12p35, IL-12p40 sowie IFN- $\gamma$  konnten nicht nachgewiesen werden.

In einem zweiten Versuch wurde die Expression der Chemokingene Ltn, RANTES, IP-10, MIP-1 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, IL-8, I-309 sowie der Housekeepinggene L32 und GAPDH analysiert.

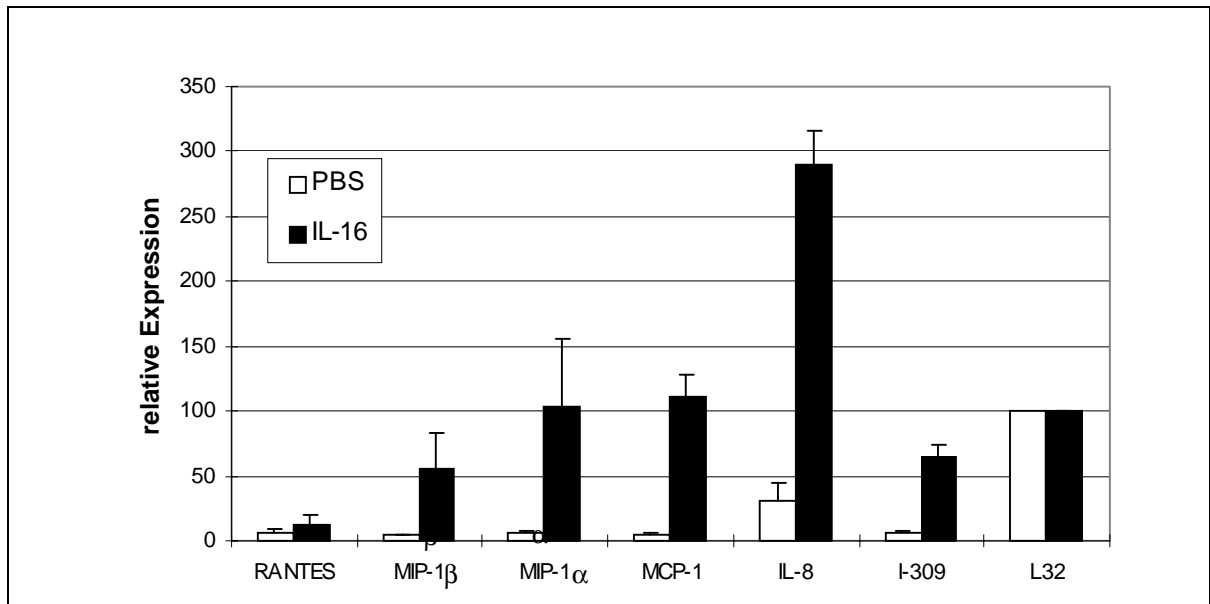


Abb.7: Genexpression von RANTES, MIP-1 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, IL-8 und I-309 durch DC. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Zytokinexpression des RPA von 5 Spendern. Die DC wurden für 18h mit IL-16 (1 $\mu$ g/ml) kultiviert. Es wurden 5 $\mu$ g RNA eingesetzt.

Die Expression der Chemokine RANTES, MIP-1 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, IL-8 und I-309 war nach Stimulation der Monozyten mit IL-16 erhöht. In den unstimulierten Monozyten war nur eine sehr geringe Menge an mRNA dieser Gene vorhanden. Die vermehrte Geninduktion nach IL-16 Stimulation war jedoch bei den unterschiedlichen Chemokinen verschieden stark. IL-8 wurde am stärksten hochreguliert, während von MIP-1 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$ , MCP-1 und I-309 nur ungefähr die Hälfte an mRNA detektiert werden konnte. RANTES wurde am wenigsten induziert. Ltn konnte weder in unbehandelten noch mit IL-16 stimulierten Monozyten nachgewiesen werden.

### 3.3.3 Zytokin und Chemokinkonzentrationen in den Überständen von Monozyten

Um Aussagen über den Aktivierungsgrad von Monozyten treffen zu können, sollten die Überstände der Zellen auf sezernierte Zytokine und Chemokine untersucht werden. Ein aktivierter Monozyt produziert neben den proinflammatorischen Zytokinen IL-6 und IL-10 auch eine Reihe Chemokine wie z.B. IL-8 und RANTES, um andere Zellen zum Ort der Entzündung zu locken. Mit Hilfe verschiedener ELISA-Kits sollte die Konzentration einiger im RNase Protection-Assay detektierter Zytokine bestimmt werden. Die Überstände wurden auf das Vorhandensein von IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , RANTES, MCP-1, MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  getestet, um zu analysieren, ob IL-16 Monozyten aktivieren kann.

Alle getesteten Zytokine und Chemokine konnten nach Stimulation der Monozyten mit IL-16 in den Überständen nachgewiesen werden.

### 3.3.3.1 Zytokinproduktion

#### IL-1

IL-1 wird von Makrophagen und Epithelzellen sezerniert. IL-1 kann Fieber hervorrufen und führt zu einer Aktivierung von Makrophagen und T-Zellen.

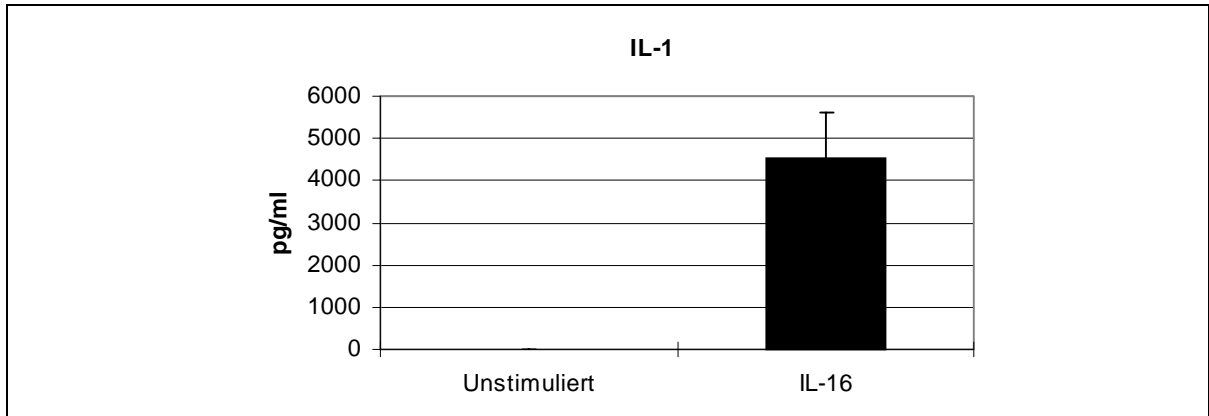


Abb.8: Einfluss von IL-16 auf die IL-1 Produktion. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen der IL-1 Konzentration in den Überständen von unstimulierten oder mit IL-16 (1 $\mu$ g/ml) stimulierten Monozyten von 10 Spendern.

Unstimulierte Monozyten produzierten kein IL-1. Nach Stimulation mit IL-16 konnte IL-1 in den Überständen nachgewiesen werden Die Konzentration betrug 4500 pg/ml.

#### IL-6

IL-6 wird von T-Zellen und aktivierten Makrophagen produziert. Die von IL-6 hervorgerufenen Immunreaktionen sind vielfältig. IL-6 kann Fieber hervorrufen, B-Zellen zu einer gesteigerten Antikörperproduktion stimulieren und die Produktion der Akutphase Proteine, wie z.B. SAP bewirken.

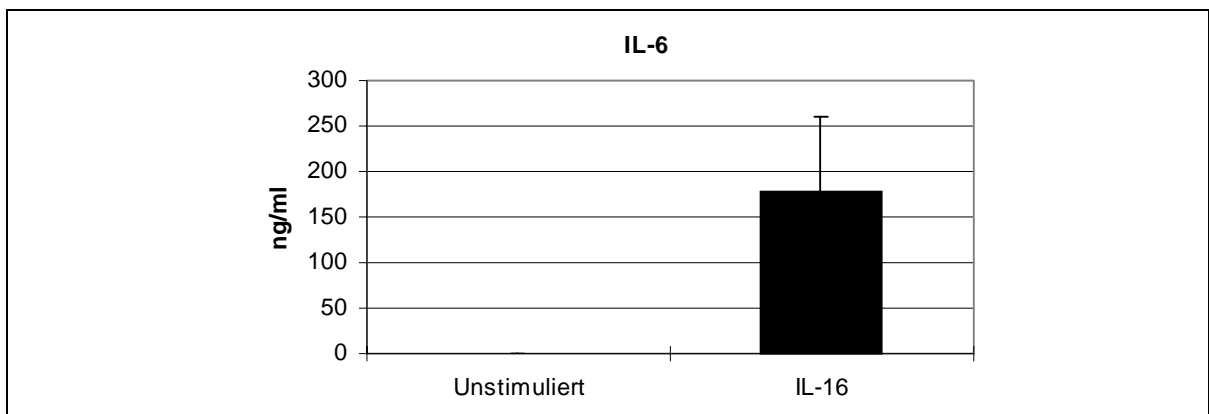


Abb.9: Einfluss von IL-16 auf die IL-6 Produktion. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen der IL-6 Konzentration in den Überständen von unstimulierten oder mit IL-16 (1 $\mu$ g/ml) stimulierten Monozyten von 10 Spendern.

Unstimulierte Monozyten produzierten kein IL-6. Nach Stimulation mit IL-16 konnte IL-6 in den Überständen nachgewiesen werden Die Konzentration betrug 170 ng/ml.

### IL-10

IL-10 wird von Makropagen und T-Zellen produziert und ist ein wie IL-4 und IL-5 ein Th2-Zytokin. Es stimuliert Mastzellen und Basophile Mediatormoleküle zu sezernieren.

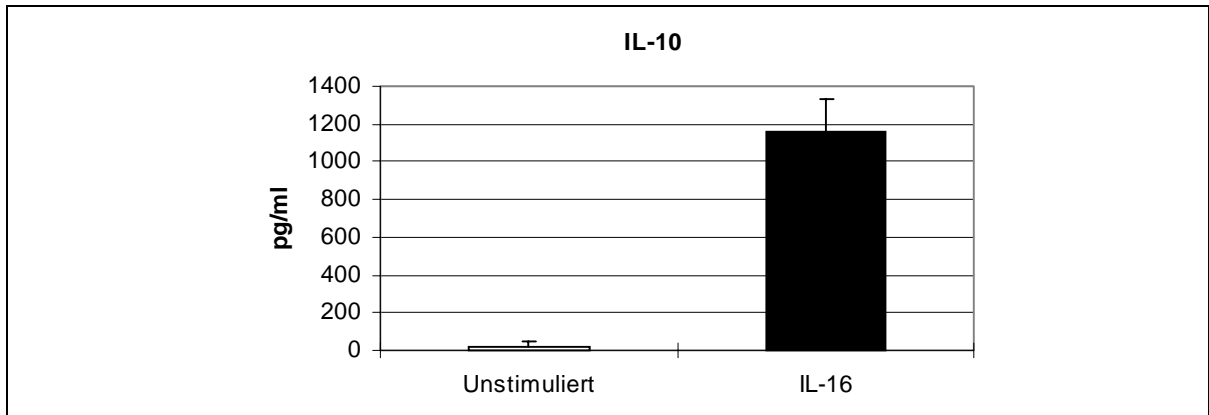


Abb.10: Einfluss von IL-16 auf die IL-10 Produktion. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen der IL-10 Konzentration in den Überständen von unstimulierten oder mit IL-16 (1 $\mu$ g/ml) stimulierten Monozyten von 10 Spendern.

Unstimulierte Monozyten produzierten sehr wenig IL-10. Nach Stimulation mit IL-16 konnte IL-10 in den Überständen nachgewiesen werden. Die Konzentration betrug 1150 pg/ml.

### TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen und Monozyten sezerniert. TNF- $\alpha$  ist ein multifunktionelles Zytokin und ist entscheidend an immunologischen und entzündlichen Reaktionen beteiligt. Es spielt eine wichtige Rolle beim endotoxischen Schock und der Regulation des Zellwachstums.

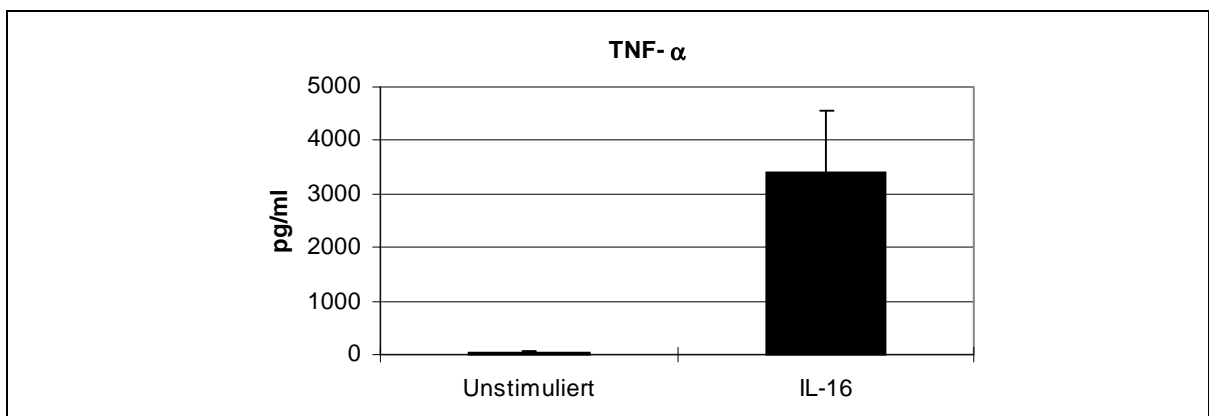


Abb.11: Einfluss von IL-16 auf die TNF- $\alpha$  Produktion. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen der TNF- $\alpha$  Konzentration in den Überständen von unstimulierten oder mit IL-16 (1 $\mu$ g/ml) stimulierten Monozyten von 10 Spendern.

Unstimulierte Monozyten produzierten kein oder nur sehr wenig TNF- $\alpha$ . Die Konzentration betrug 33 pg/ml. Nach Stimulation mit IL-16 war die Konzentration von TNF- $\alpha$  in den Überständen deutlich erhöht. Die Konzentration betrug 3380 pg/ml.

### 3.3.3.2 Chemokinproduktion

#### RANTES

RANTES ist ein unglykolysiertes Protein der C-C-Chemokinfamilie und wird von zirkulierenden T-Zellen synthetisiert. Die wichtigste biologische Funktion ist die Chemoattraktion von T-Zellen, Monozyten, Eosinophilen und Basophilen. Es ist auch an der Ausschüttung von Histamin und der Adhäsion von Monozyten an endotheliale Zellen beteiligt.

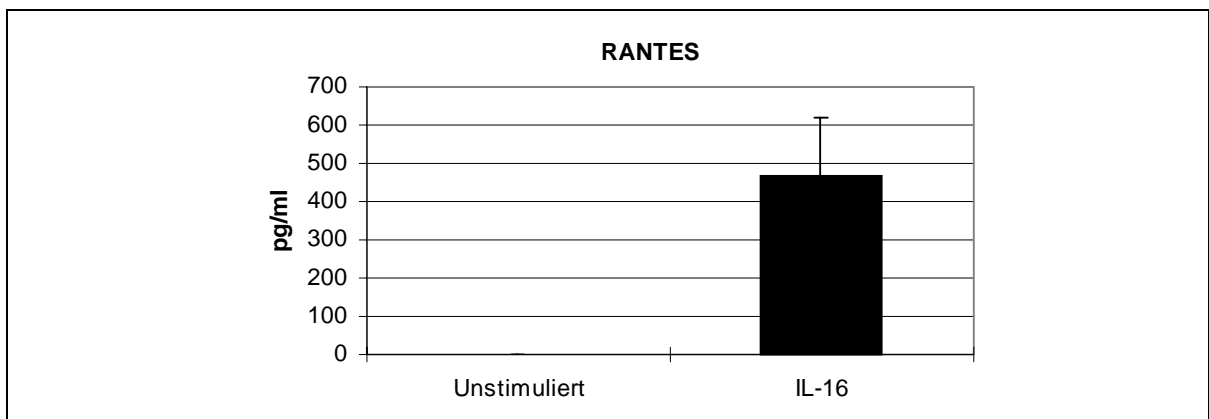


Abb.12: Einfluss von IL-16 auf die RANTES Produktion. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen der RANTES Konzentration in den Überständen von unstimulierten oder mit IL-16 (1 $\mu$ g/ml) stimulierten Monozyten von 10 Spendern.

Unstimulierte Monozyten produzierten kein RANTES. Nach Stimulation mit IL-16 konnte RANTES in den Überständen nachgewiesen werden. Die Konzentration betrug 460 pg/ml.

#### IL-8

IL-8 ist das am längsten bekannte Chemokin. Es wird von vielen Zellen produziert wie z.B. von Makrophagen, DC und T-Zellen. Es wirkt chemotaktisch auf Neutrophile und T-Zellen.

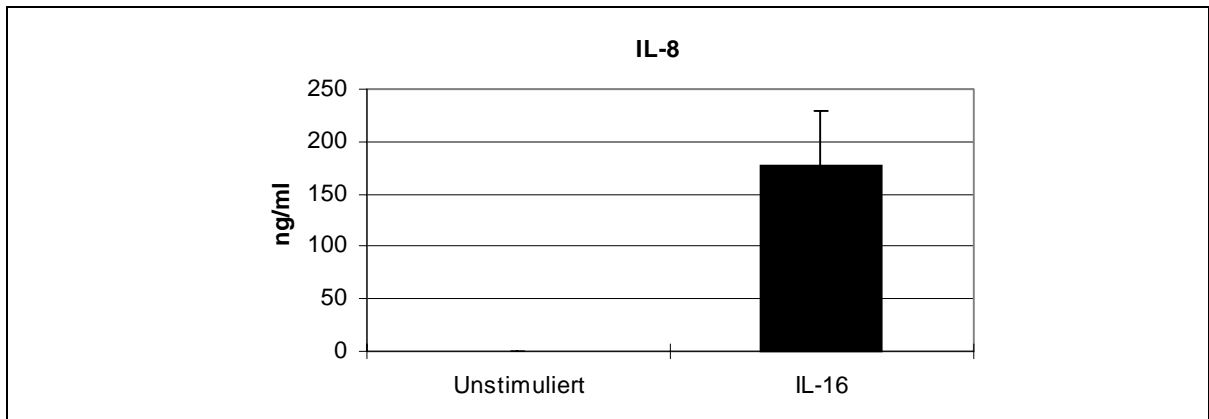


Abb.13: Einfluss von IL-16 auf die IL-8 Produktion. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen der IL-8 Konzentration in den Überständen von unstimulierten oder mit IL-16 (1 $\mu$ g/ml) stimulierten Monozyten von 10 Spendern.

Unstimulierte Monozyten produzierten kein IL-8. Nach Stimulation mit IL-16 konnte sehr viel IL-8 in den Überständen nachgewiesen werden. Die Konzentration betrug 170 ng/ml. Diese starke Produktion von IL-8 korreliert mit dem Ergebnis des RPA. Auch dort konnte eine starke Induktion des IL-8 Gens nachgewiesen und damit eine große Menge an mRNA detektiert werden.

### MCP-1

MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein) ist ein kleines Protein der C-C-Familie. Es wird durch Makrophagen, DC und T-Zellen sezerniert. Es tritt häufig bei chronischen Prozessen auf, die durch Monozyten kontrolliert werden.

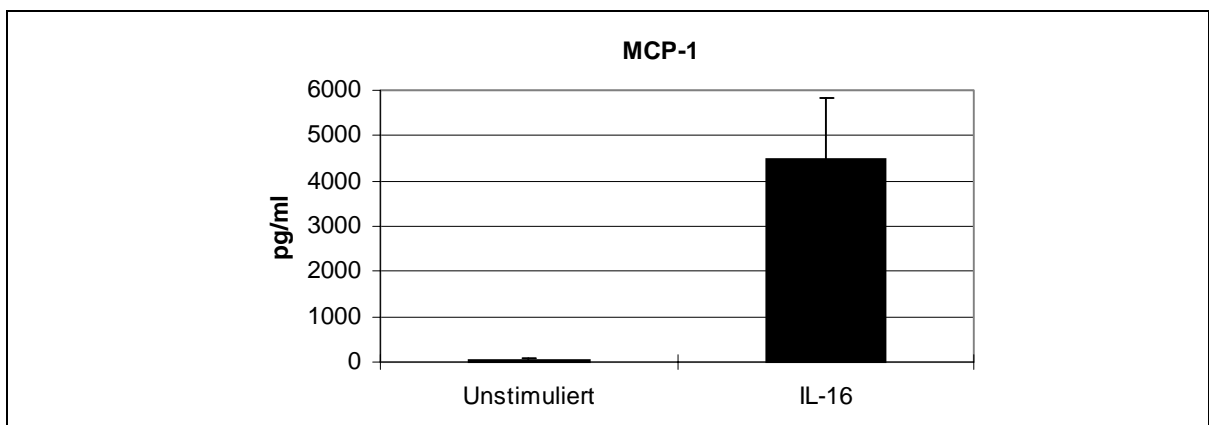


Abb.14: Einfluss von IL-16 auf die MCP-1 Produktion. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen der MCP-1 Konzentration in den Überständen von unstimulierten oder mit IL-16 (1 $\mu$ g/ml) stimulierten Monozyten von 10 Spendern.

Unstimulierte Monozyten produzierten kein oder nur sehr wenig MCP-1. Die Konzentration betrug 34 pg/ml. Nach Stimulation mit IL-16 war die Konzentration von MCP-1 in den Überständen deutlich erhöht. Die Konzentration betrug 4460 pg/ml.

### MIP-1 $\alpha$

MIP-1 $\alpha$  wird von Makrophagen sezerniert. Es wirkt chemotaktisch auf Monozyten, T-Zellen und Eosinophile.

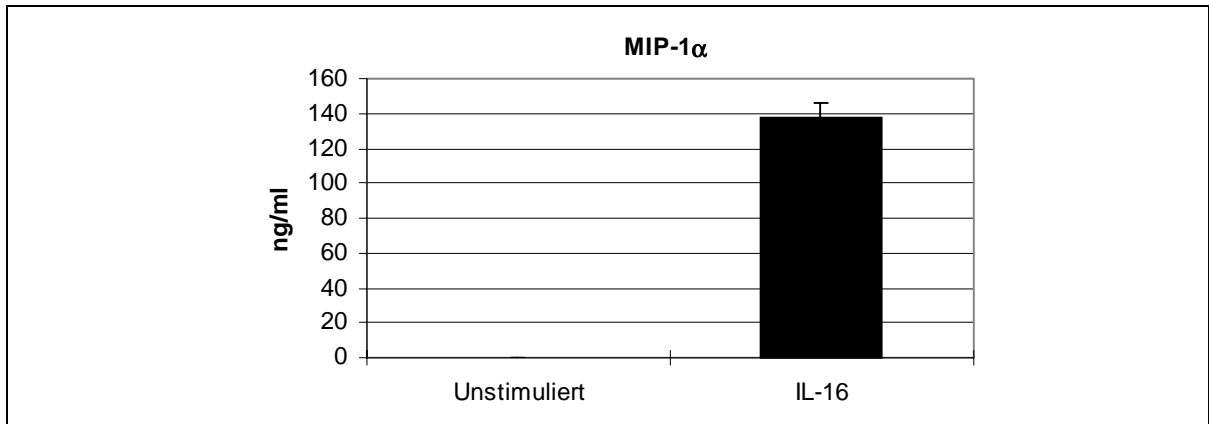


Abb.15: Einfluss von IL-16 auf die MIP-1 $\alpha$  Produktion. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen der MIP-1 $\alpha$  Konzentration in den Überständen von unstimulierten oder mit IL-16 (1 $\mu$ g/ml) stimulierten Monozyten von 10 Spendern.

Unstimulierte Monozyten produzierten kein MIP-1 $\alpha$ . Nach Stimulation mit IL-16 konnte MIP-1 $\alpha$  in den Überständen nachgewiesen werden. Die Konzentration betrug 130 ng/ml.

### MIP-1 $\beta$

MIP-1 $\beta$  wird von T- und B-Zellen sowie Monozyten sezerniert. Es lockt Monozyten und T-Zellen an.

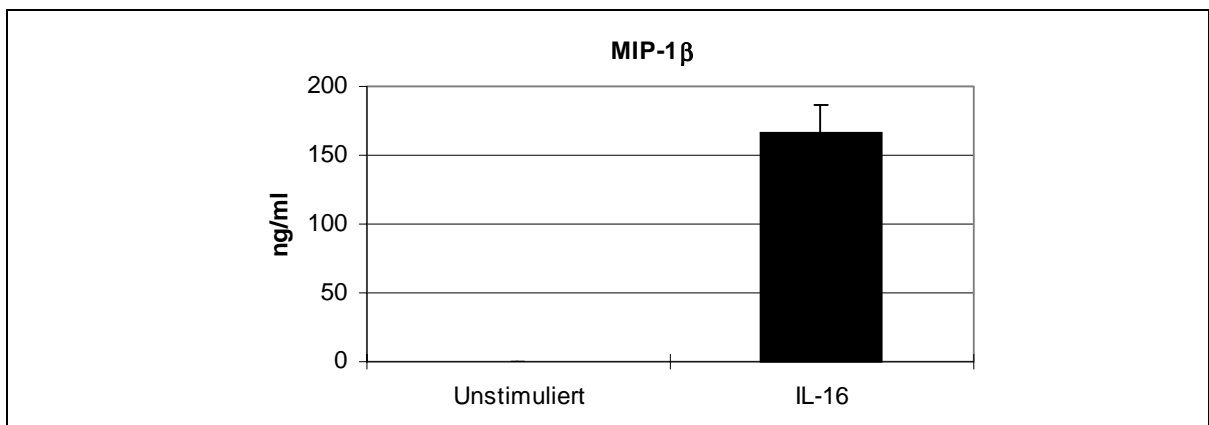


Abb.16: Einfluss von IL-16 auf die MIP-1 $\beta$  Produktion. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen der MIP-1 $\beta$  Konzentration in den Überständen von unstimulierten oder mit IL-16 (1 $\mu$ g/ml) stimulierten Monozyten von 10 Spendern.

Unstimulierte Monozyten produzierten kein MIP-1 $\beta$ . Nach Stimulation mit IL-16 konnte MIP-1 $\beta$  in den Überständen nachgewiesen werden. Die Konzentration betrug 160 ng/ml.



### 3.3.4 Chemotaktische Wirkung von IL-16 auf Monozyten

Die Chemotaxis wurde in 200  $\mu\text{l}$  Blindwell Kammern (Costar) durchgeführt. In die unteren Kammern wurde 100  $\mu\text{l}$  Stimulus (Medium als Negativkontrolle,  $2 \times 10^{-8}$  M FMLP als Positivkontrolle und IL-16 in verschiedenen Konzentrationen) pipettiert. In die obere Kammer, die durch eine Membran von der oberen Kammer getrennt war, wurden die Monozyten ( $1 \times 10^5$  Zellen) gegeben. Die Zellen, die durch die Membran in die untere Kammer gewandert waren, wurden lysiert und das Enzym  $\beta$ -Glucuronidase im Lysat gemessen. Anhand einer Eichgerade wurde die Anzahl der durch die Membran in die untere Kammer gewanderten Monozyten bestimmt. Die einzelnen Proben wurden am Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Eichreihe (Abb. 17) mit definierten Zellzahlen an Monozyten angesetzt.

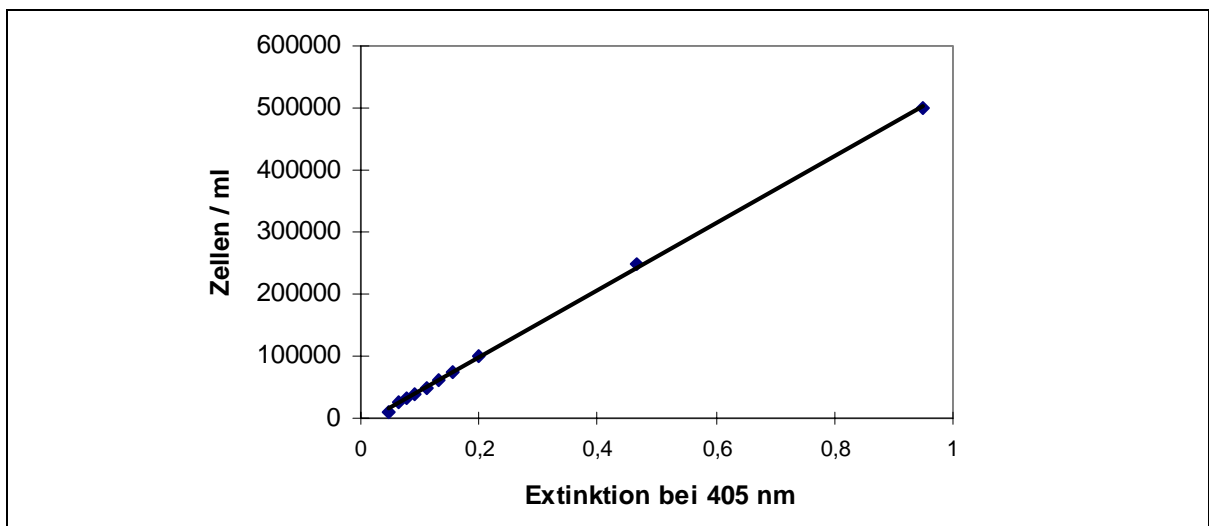


Abb.17: Eichreihe für die Zellzahlbestimmung der Chemotaxis

Die chemotaktische Wirkung von IL-16 auf Monozyten wurde untersucht. Es wurden sowohl frische als auch 24 Stunden in Kultur gehaltene Zellen eingesetzt. IL-16 wurde in den Konzentrationen 2000 pg/ml, 200 pg/ml, 20 pg/ml und 2 pg/ml eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde FMLP in einer Konzentration von 20 nM eingesetzt. Die Zellzahlen der Monozyten aus der unteren Kammer der Mediumkontrolle, der Positivkontrolle mit FMLP sowie von IL-16 sind in den Abbildungen 18a und 18b dargestellt.

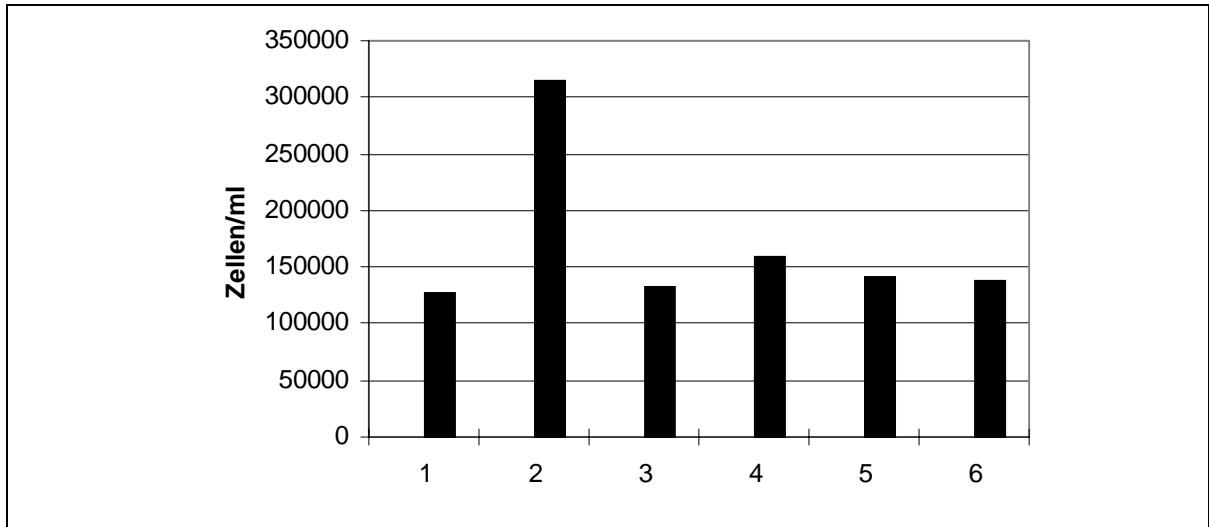


Abb.18a: Zellkonzentration der frischen Monozyten nach Behandlung mit IL-16

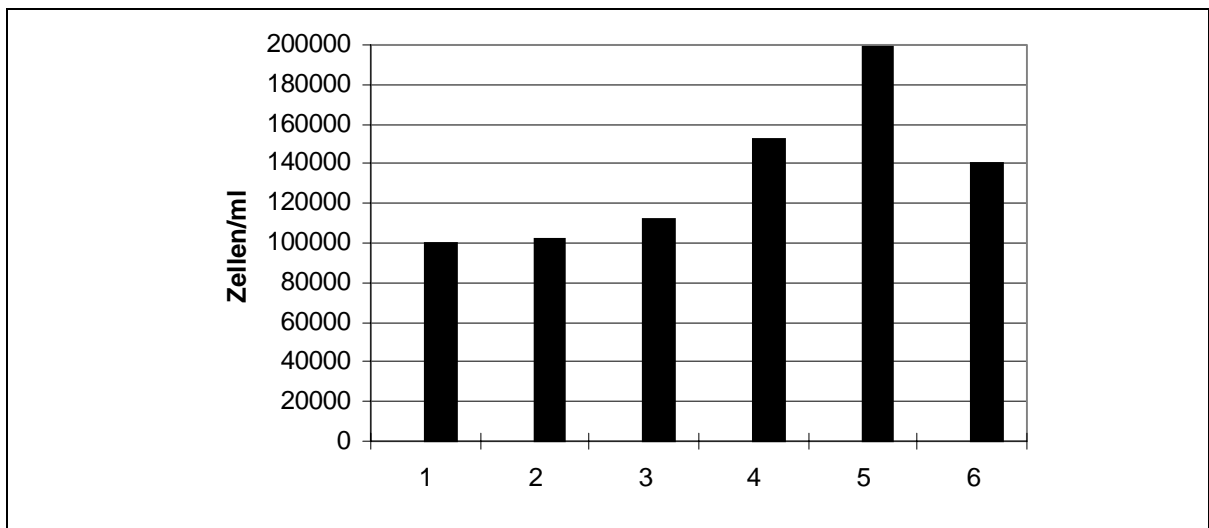


Abb.18b: Zellkonzentration der 24h alten Monozyten nach Behandlung mit IL-16

Abb.18: Zellkonzentration der Monozyten bei den verschiedenen Ansätzen der Chemotaxis. Die Zellkonzentration wurde aus der Eichreihe (Abb.17) ermittelt.

18a,b: 1: Kontrolle                      2: FMLP (20nM)                      3: IL-16 (2000pg/ml)  
           4: IL-16 (200pg/ml)            5: IL-16 (20pg/ml)                6: IL-16 (2pg/ml)

Zur besseren Übersicht wurde für jede Probe ein chemotaktischer Index bestimmt. Dieser ergab sich durch Division des Extinktionswertes der Probe durch den Extinktionswert der Mediumkontrolle.

chemotaktischer Index = Extinktion der Probe / Extinktion der Mediumkontrolle

Liegt dieser chemotaktische Index deutlich über 1,0 (1,5 und höher), so kann dieser Ansatz als chemotaktisch positiv bewertet werden. Ein Index von 1,0 bedeutet, dass kein

Unterschied zwischen der Mediumkontrolle und der Probe vorhanden ist, also auch keine chemotaktische Aktivität des betreffenden Stoffes vorliegt. In Tabelle 4 sind die Werte für den chemotaktischen Index der in Abbildung 18 dargestellten Ansätze eingetragen.

	<u>Chemotaktischer Index</u>	
	frische Monozyten	24h alte Monozyten
FMLP (20nM)	2,4	1,0
rIL-16 2000 pg/ml	1,0	1,4
200 pg/ml	1,2	1,7
20 pg/ml	1,1	1,8
2 pg/ml	1,1	1,6

Tab. 4: Chemotaktischer Index der Proben

Aus der Abbildung 18a sowie Tabelle 4 ist zu entnehmen, dass FMLP chemotaktisch auf frische Monozyten wirkte. Der chemotaktische Index lag bei 2,3, was bedeutet, dass mehr als doppelt so viele Monozyten durch die Membran in die untere Vertiefung der Kammer gewandert sind als bei der Kontroll-Kammer mit Medium. Auf 24 Stunden alte Monozyten (Abb.18b) hatte FMLP jedoch keine chemotaktische Wirkung. Der chemotaktische Index lag bei 1,0 und entsprach somit dem Kontrollwert.

Bei IL-16 war das Ergebnis umgekehrt. Bei frischen Monozyten (Abb. 18a ) war keine oder nur eine geringe Erhöhung des chemotaktischen Index im Vergleich zum Kontrollwert nachweisbar. Kein Wert lag über 1,2. Somit wirkte IL-16 nicht chemotaktisch auf frische Monozyten. Bei 24 Stunden alten Monozyten (Abb. 18b) war jedoch eine deutliche Erhöhung des chemotaktischen Index nachweisbar. Der chemotaktische Index nahm durch IL-16 bei Verringerung der Konzentration von 2000 pg/ml auf 20 pg/ml zu. Wurde die IL-16 Konzentration noch weiter auf 2 pg/ml gesenkt, sank auch der chemotaktische Index.. Daraus lässt sich schließen, dass zu hohe IL-16 Konzentrationen die Monozytenwanderung leicht hemmen.

### 3.4 Differenzierung von Monozyten zu DC

Die isolierten Monozyten wurden in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen /ml mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. An Tag 1, 3, 5 und 7 wurden unstimulierte und 18h mit IL-16 stimulierte Zellen entnommen, um den Differenzierungsverlauf und die Aktivierbarkeit durch IL-16 anhand der Expression DC spezifischer Oberflächenmoleküle zu charakterisieren.

#### 3.4.1 Expression verschiedener Oberflächenantigene im Verlauf der DC Differenzierung

Bei der Differenzierung von Monozyten zu DC und der Ausreifung zu DC zeigt sich eine Veränderung der Expression verschiedener Oberflächenantigene. DC typische Marker wie z.B. CD1a und CD83 sind auf Monozyten nicht vorhanden. Die Expression dieser Oberflächenmoleküle sollte im Verlauf der Differenzierung von Monozyten und der Ausreifung zu DC zunehmen.

Die entnommenen Zellen wurden an Tag 1, 3, 5 und 7 auf die Expression von CD1a und CD83 untersucht. Außerdem wurde die Größe und Granularität der Zellen bestimmt.

#### Tag 1

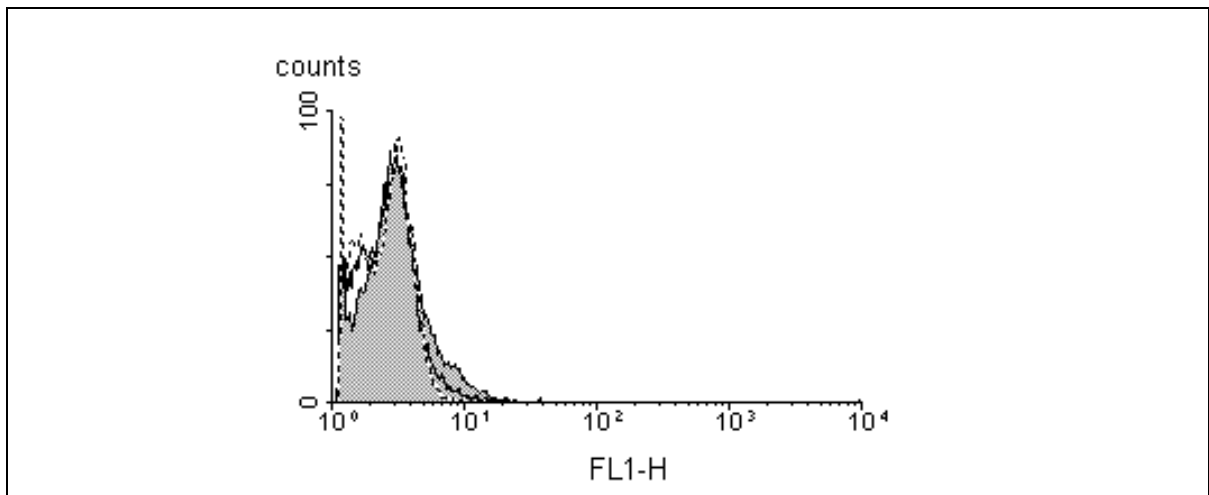


Abb.19a: CD1a Expression an Tag 1. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der Simultestkontrolle (gepunktete Linie), der unstimulierten DC (durchgehende Linie) und IL-16 stimulierter DC (grau ausgefüllte Linie).

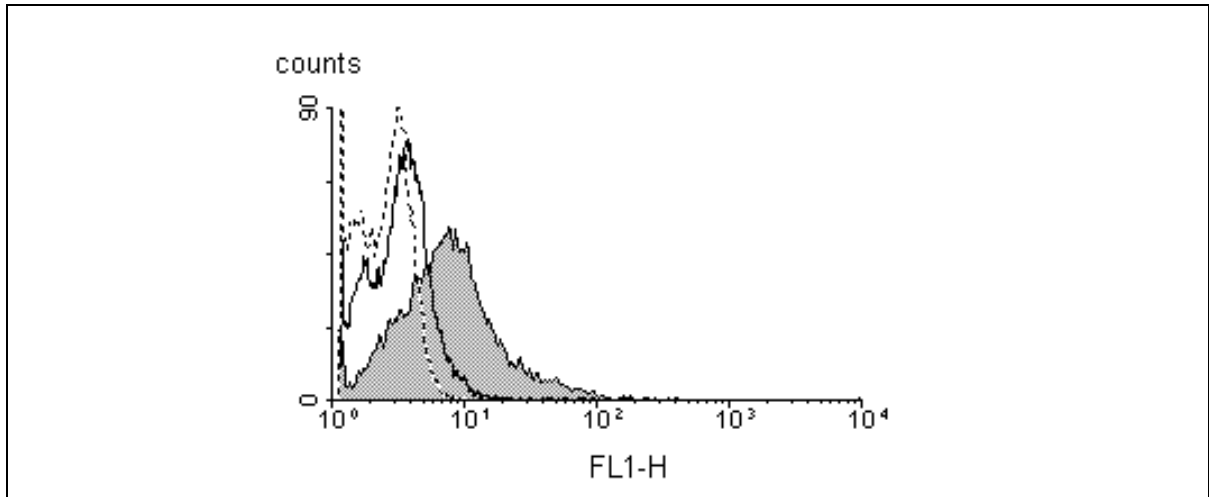


Abb.19b: CD83 Expression an Tag 1. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der Simultestkontrolle (gepunktete Linie), der unstimulierten DC (durchgehende Linie) und IL-16 stimulierter DC (grau ausgefüllte Linie).

Die unstimulierten Zellen exprimierten kein CD1a und nur sehr wenig CD83. Die Stimulation der Zellen mit IL-16 hatte keine Auswirkung auf die CD1a Expression. CD83 wurde auf diesen IL-16 stimulierten Zellen schwach exprimiert, aber jedoch deutlich stärker als auf unbehandelten Zellen.

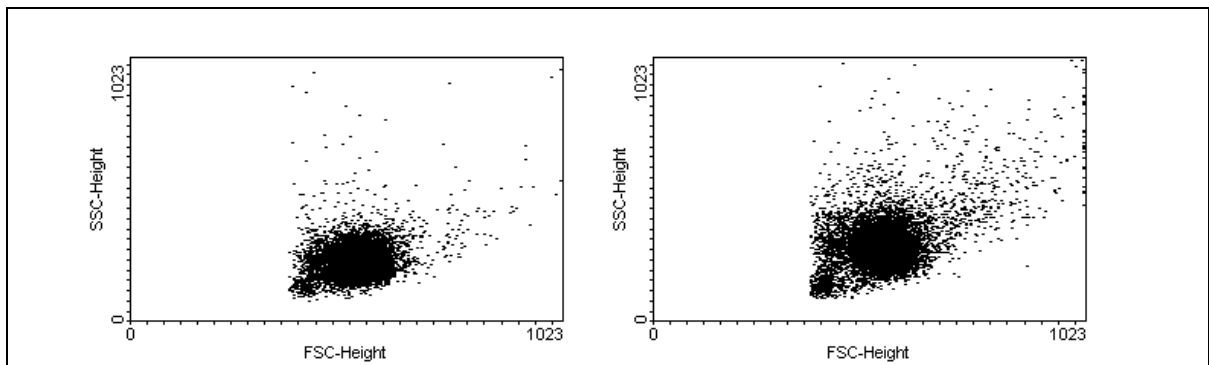


Abb.20a: unstimulierte DC an Tag 1

Abb.20b: DC nach IL-16 Stimulation an Tag 1

Die unstimulierten Zellen sahen im Dot Blot wie eine Monozytenpopulation aus. Durch Stimulation mit IL-16 wurden sie etwas größer und granulärer.

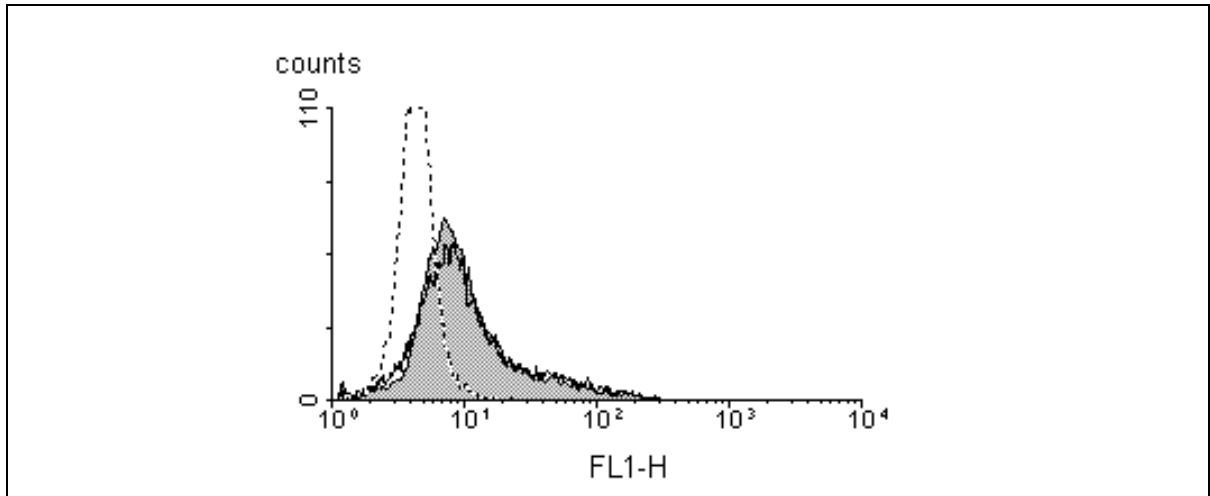
**Tag 3**

Abb.21a: CD1a Expression an Tag 3. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der Simultestkontrolle (gepunktete Linie), der unstimulierten DC (durchgehende Linie) und IL-16 stimulierter DC (grau ausgefüllte Linie).

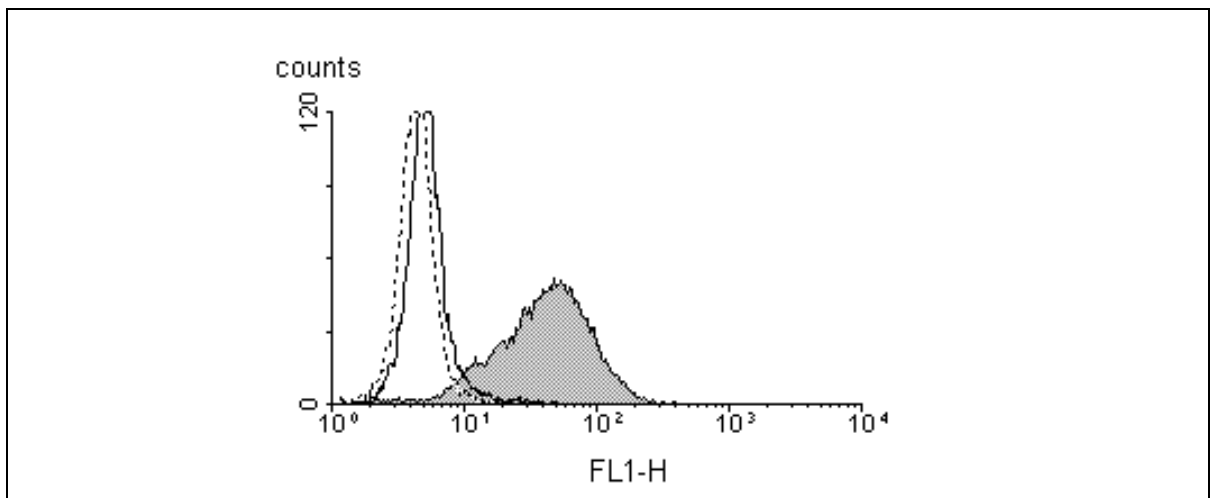


Abb.21b: CD83 Expression an Tag 3. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der Simultestkontrolle (gepunktete Linie), der unstimulierten DC (durchgehende Linie) und IL-16 stimulierter DC (grau ausgefüllte Linie).

Die unstimulierten Zellen exprimierten kein CD83. CD1a war an Tag 3 sehr schwach exprimiert, aber stärker als an Tag 1. Die Stimulation der Zellen mit IL-16 hatte keinen Einfluss auf die CD1a Expression. CD83 wurde nach Stimulation mit IL-16 viel stärker auf der Zellmembran exprimiert als auf den unstimulierten Zellen und den IL-16 stimulierten Zellen von Tag 1.

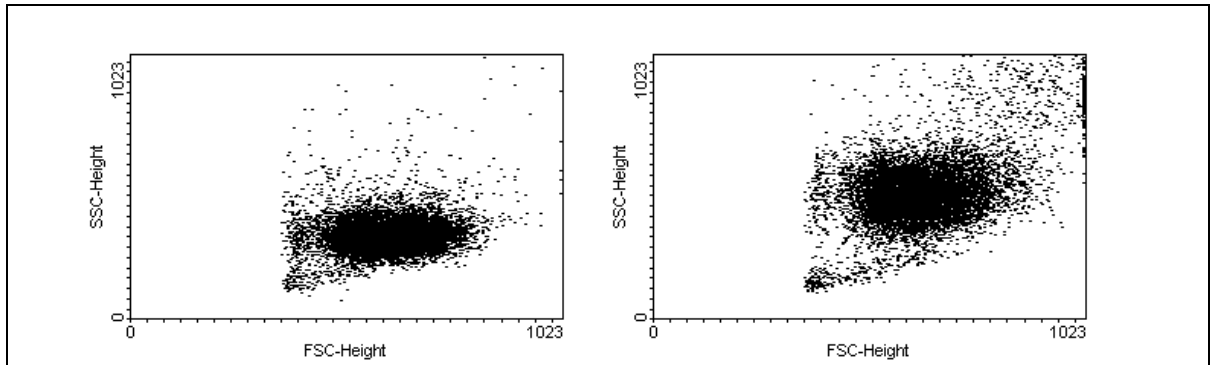


Abb.22a: unstimulierte DC an Tag 3

Abb.22b: IL-16 stimulierte DC an Tag 3

Sowohl die unstimulierten als auch die mit IL-16 behandelten Zellen waren größer als die Zellen von Tag 1. Auch hier waren die stimulierten Zellen größer als die unbehandelten DC.

### Tag 5

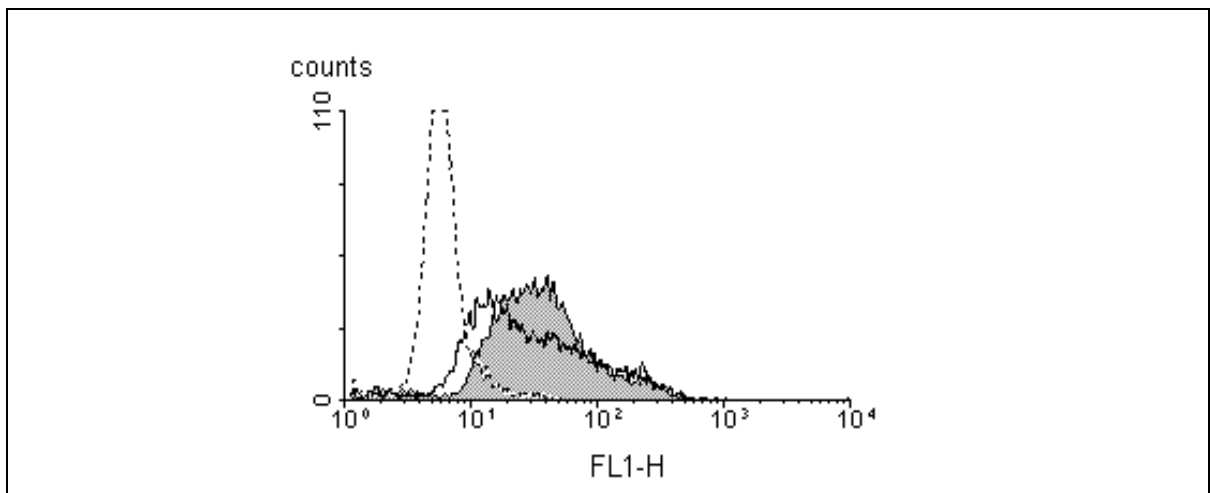


Abb.23a: CD1a Expression an Tag 5. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der Simultestkontrolle (gepunktete Linie), der unstimulierten DC (durchgehende Linie) und IL-16 stimulierter DC (grau ausgefüllte Linie).

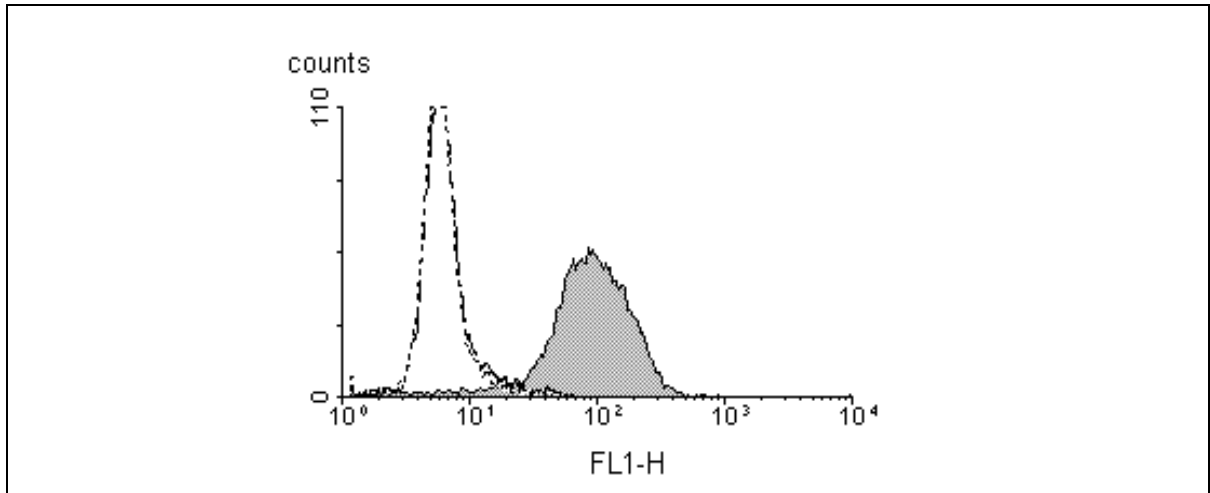


Abb23.b: CD83 Expression an Tag 5. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der Simultestkontrolle (gepunktete Linie), der unstimulierten DC (durchgehende Linie) und IL-16 stimulierter DC (grau ausgefüllte Linie).

Die unstimulierten Zellen exprimierten kein CD83. Die CD1a Expression war stärker als an Tag 3. Durch Stimulation mit IL-16 kam es zu einer Erhöhung der CD83 Expression, wobei diese Zunahme gleich stark war, wie an Tag 3. Die Expression von CD1a wurde durch Stimulation mit IL-16 nur sehr schwach erhöht.

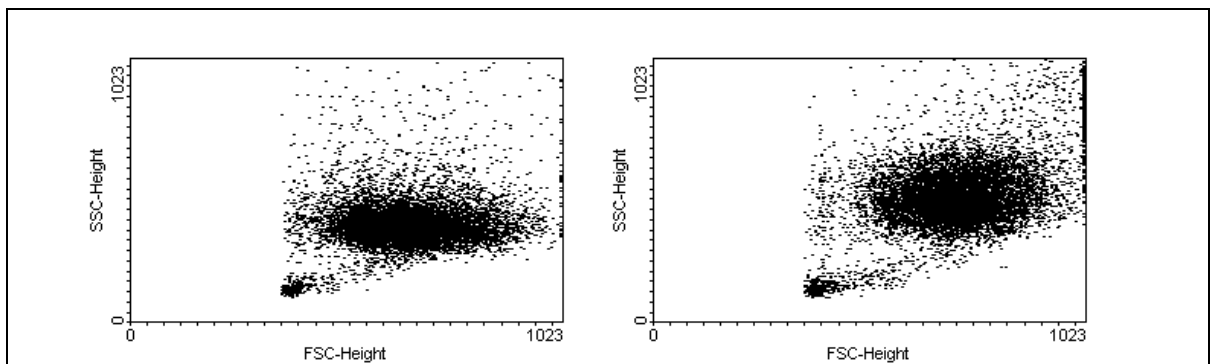


Abb.24a: unstimulierte DC an Tag 5

Abb.24b: IL-16 stimulierte DC an Tag 5

Die unstimulierten Zellen waren deutlich größer als an Tag 3. Durch Stimulation der Zellen mit IL-16 wurden diese größer und vor allem granulärer. Die Veränderungen waren stärker als an Tag 3.



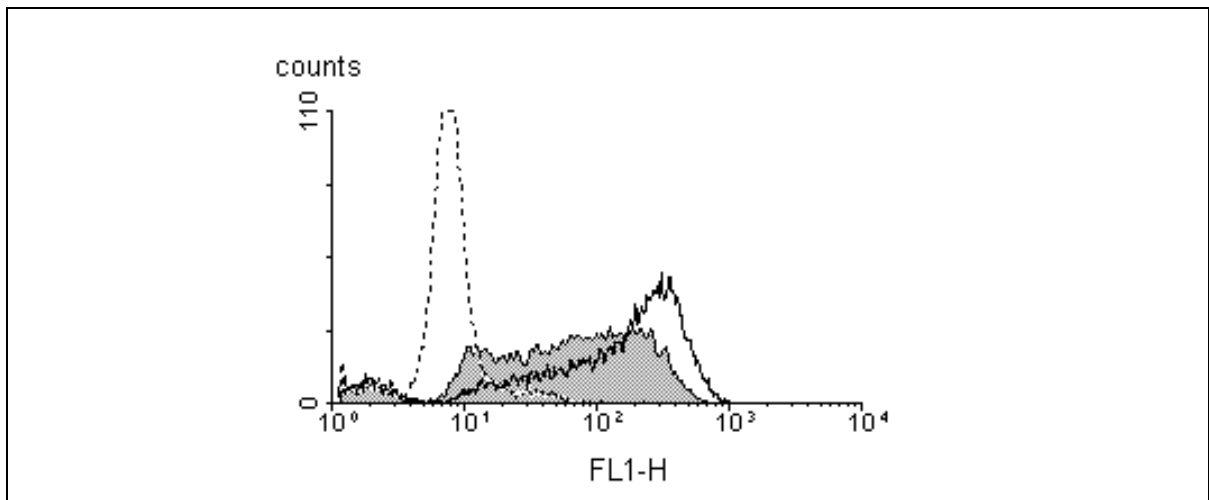
**Tag 7**

Abb.25a: CD1a Expression an Tag 7. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der Simultestkontrolle (gepunktete Linie), der unstimulierten DC (durchgehende Linie) und IL-16 stimulierter DC (grau ausgefüllte Linie).

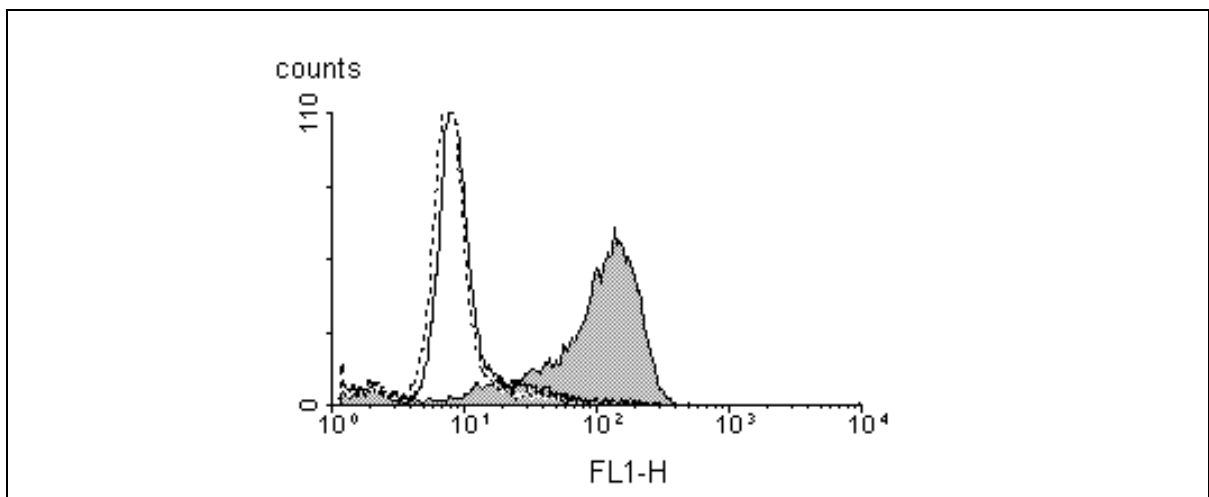


Abb.25b: CD83 Expression an Tag 7. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der Simultestkontrolle (gepunktete Linie), der unstimulierten DC (durchgehende Linie) und IL-16 stimulierter DC (grau ausgefüllte Linie).

Die unstimulierten Zellen exprimierten kein CD83. Die CD1a Expression war höher als an Tag 5. Durch Stimulation mit IL-16 kam es zu einer Erhöhung der CD83 Expression wie an Tag 3 und 5. Die CD1a Expression war nach Stimulation mit IL-16 etwas schwächer.

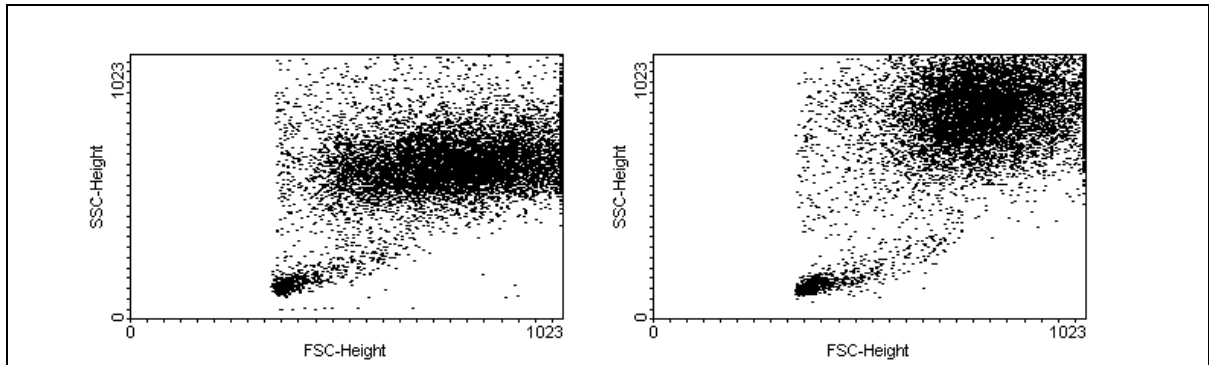


Abb.26a: unstimulierte DC an Tag 7

Abb.26b: IL-16 stimulierte DC an Tag 7

Die unstimulierten Zellen waren deutlich größer und viel granulärer als an Tag 5. Durch Stimulation mit IL-16 wurden sie deutlich größer und granulärer wobei die Veränderungen stärker waren als an Tag 5.

Im Verlauf der Kultur der Zellen mit GM-CSF und IL-4 konnte der DC Marker CD1a erstmals an Tag 3 nachgewiesen werden und seine Expression nahm bis Tag 7 kontinuierlich zu. Die Stimulation mit IL-16 hatte keinen Einfluss auf die CD1a Expression. CD83 konnte zu keiner Zeit auf den unstimulierten Zellen nachgewiesen werden. Erst durch Stimulation mit IL-16 wurde die CD83 Expression an allen Tagen erhöht. Neben diesen Veränderungen der Oberflächenmoleküle sind die Zellen im Verlauf der Kultur von Tag 1 bis Tag 7 stetig gewachsen und granulärer geworden. Die Zugabe von IL-16 führte stets zu einer Zunahme der Größe und Granularität der Zellen wobei dieses Wachstum zum Ende der Kultur hin immer stärker wurde.

### 3.5 Stimulierung der DC mit IL-16

Die isolierten Monozyten wurden wie unter beschrieben mit IL-4 und GM-CSF für 7 Tage kultiviert und an Tag 7 für 18h mit IL-16 stimuliert. Anschließend wurden die Überstände bei -20°C eingefroren, die Zellen für die Durchflußzytometrie, die MLR sowie den RNase-Protection Assay weiterbehandelt.

#### 3.5.1 Einfluss von IL-16 auf die Expression verschiedener Oberflächenantigene

Ziel dieser Untersuchung war es, die unreifen sowie die mit IL-16 stimulierten DC phänotypisch zu charakterisieren und zu beweisen, dass es sich bei den hier generierten Zellen um DC handelte. DC lassen sich phänotypisch durch die Expression unterschiedlicher Oberflächenantigene von Monozyten abgrenzen. Neben CD1a sind die Moleküle CD83 und CD86 entscheidend, da sie auf Monozyten nicht zu finden sind. Die

Expression dieser Oberflächenantigene nimmt während der Ausreifung zu DC zu. Daneben sind CD40, CD54 sowie HLA-DR vermehrt auf reifen DC exprimiert. Des weiteren nimmt die Expression des Monozytenmarkers CD14 während der Ausreifung von Monozyten zu DC ab. Die Anzahl dieser Oberflächenmoleküle verändert sich während der Reifung und Differenzierung zu DC. Veränderungen dieser Moleküle bedeuten auch eine Veränderung der Eigenschaften und Funktionen der DC. Um eine Aussage über den Reife- oder Aktivierungsgrad von DC machen zu können, wurden die Expression der Oberflächenantigene CD1a, CD4, CD14, CD25, CD40, CD54, CD83, CD86 und HLA-DR durchflußzytometrisch bestimmt. Unbehandelte sowie mit IL-16 stimulierte DC wurden nach der Stimulation mit dem 1. Antikörper inkubiert. An diesen ersten AK wurde ein zweiter FITC markierter Antikörper gekoppelt und die so gefärbten Zellen im FACScan ausgewertet.

### CD1a Expression

Die Expression von CD1a wird während der Differenzierung zu DC induziert. Es ist auf Monozyten nicht vorhanden. CD1a hat eine ähnliche Funktion wie MHC-1-Moleküle und damit möglicherweise eine besondere Bedeutung bei der Antigenpräsentation. Es gehört zur Immunglobulinsuperfamilie.

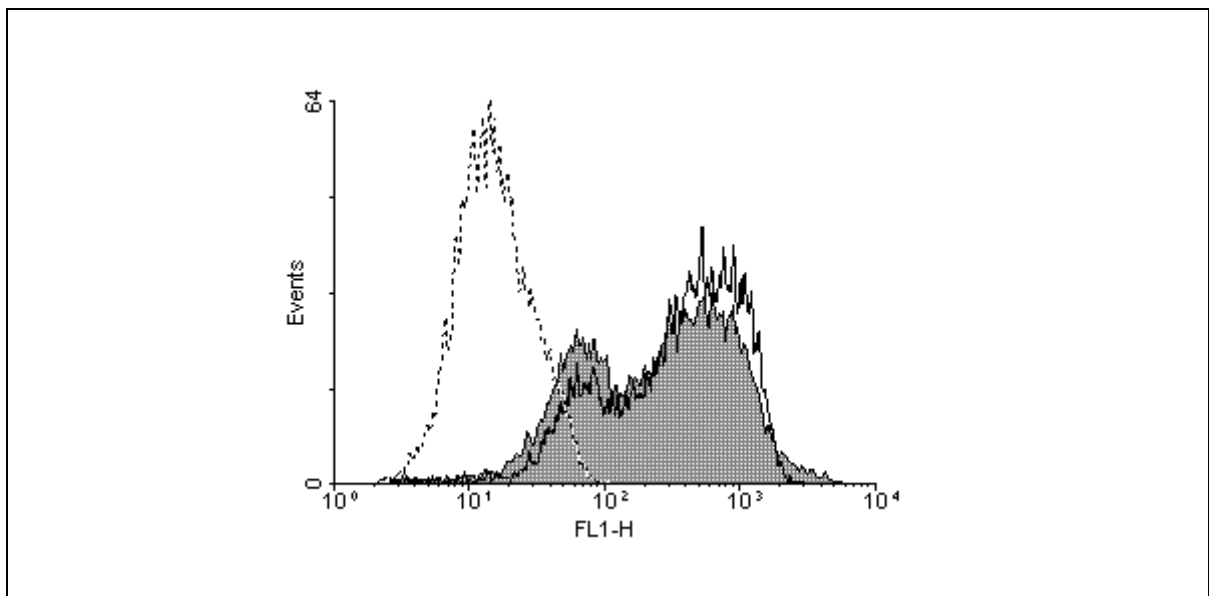


Abb.27: Anstieg der CD1a Expression bei DC nach IL-16 Stimulation. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der Simultestkontrolle (gepunktete Linie), der unstimulierten DC (durchgehende Linie) und IL-16 stimulierter DC (grau ausgefüllte Linie).

In der Abbildung 27 sind die Fluoreszenzintensitäten der an CD1a gekoppelten Antikörper von unstimulierten, mit IL-16 stimulierten DC sowie die Simultestkontrolle dargestellt. Unstimulierte DC exprimierten CD1a. Durch Stimulation mit IL-16 war keine Veränderung der CD1a Expression im Vergleich zu den unbehandelten DC nachweisbar.

### CD4 Expression

CD4 ist der Korezeptor für MHC-2 Moleküle und der Rezeptor für IL-16. CD4 gehört zur Immunglobulinsuperfamilie und ist auf T-Helferzellen, inflammatorischen T-Zellen sowie Monozyten und DC exprimiert.

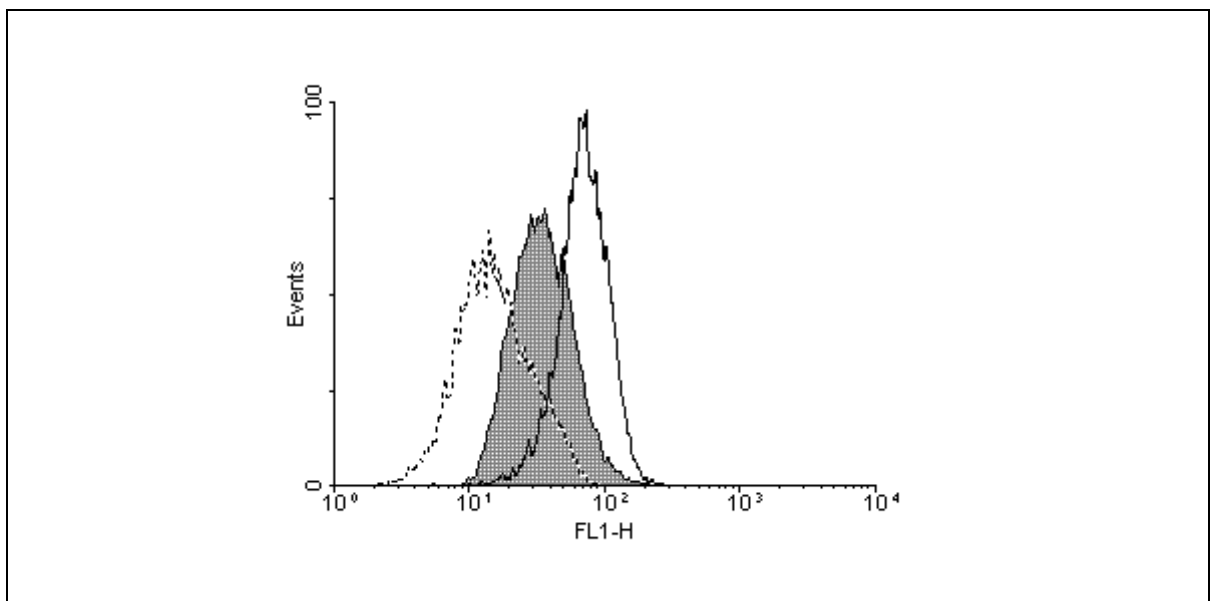


Abb.28: Abnahme der CD4 Expression bei DC nach IL-16 Stimulation. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der Simultestkontrolle (gepunktete Linie), der unstimulierten DC (durchgehende Linie) und IL-16 stimulierter DC (grau ausgefüllte Linie).

In der Abbildung 28 sind die Fluoreszenzintensitäten der an CD4 gekoppelten Antikörper von unstimulierten, mit IL-16 stimulierten DC sowie die Simultestkontrolle dargestellt. Unstimulierte DC exprimierten CD4. Die CD4 Expression ging nach Stimulation der DC mit IL-16 zurück, jedoch war auch auf diesen stimulierten DC noch CD4 auf der Zelloberfläche nachweisbar.

## CD14 Expression

CD14 ist der Rezeptor für den Komplex aus Lipopolysaccharid (LPS) und lipopolysaccharidbindendem Protein (LBP). Er ist ein typischer Zellmarker für myelomonocytische Zellen. Während der Differenzierung zu DC geht die Expression von CD14 zurück.

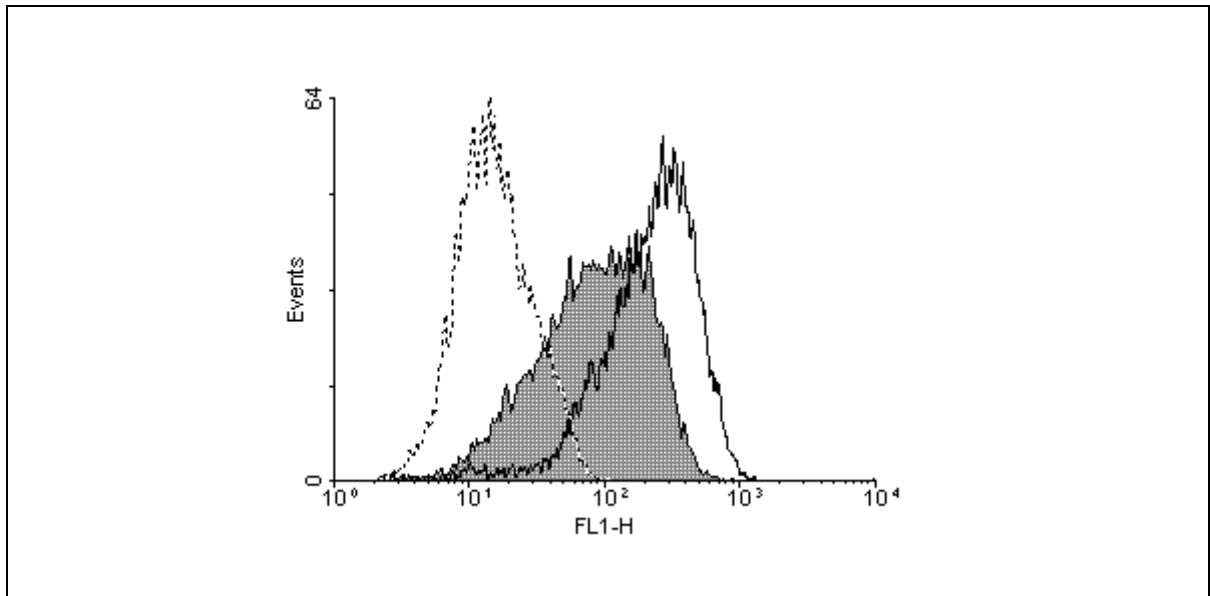


Abb.29: Abnahme der CD14 Expression bei DC nach IL-16 Stimulation. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der Simultestkontrolle (gepunktete Linie), der unstimulierten DC (durchgehende Linie) und IL-16 stimulierter DC (grau ausgefüllte Linie).

In der Abbildung 29 sind die Fluoreszenzintensitäten der an CD14 gekoppelten Antikörper von unstimulierten, mit IL-16 stimulierten DC sowie die Simultestkontrolle dargestellt.

Unstimulierte DC exprimierten CD14. Die CD14 Expression ging nach Stimulation der DC mit IL-16 zurück, jedoch war auch auf diesen stimulierten DC noch CD14 auf der Zelloberfläche nachweisbar.

### CD25 Expression

CD25 ist die  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors und ein typischer Aktivierungsmarker. Er ist auf T-Lymphozyten und Monozyten nach Stimulation mit IL-16 erhöht.

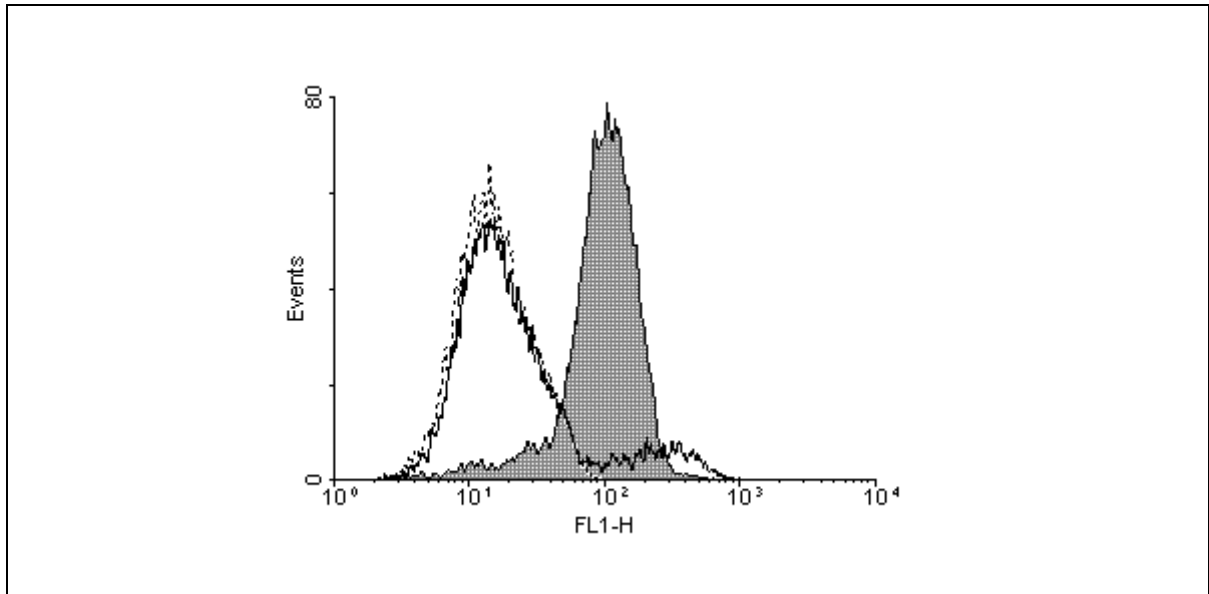


Abb.30: Anstieg der CD25 Expression bei DC nach IL-16 Stimulation. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der Simultestkontrolle (gepunktete Linie), der unstimulierten DC (durchgehende Linie) und IL-16 stimulierter DC (grau ausgefüllte Linie).

In der Abbildung 30 sind die Fluoreszenzintensitäten der an CD25 gekoppelten Antikörper von unstimulierten, mit IL-16 stimulierten DC sowie die Simultestkontrolle dargestellt. Unstimulierte DC exprimierten kein oder nur sehr wenig CD25. Nach Stimulation mit IL-16 war eine deutliche Erhöhung der CD25 Expression nachweisbar.

### CD40 Expression

CD40 ist ein Mitglied der NGF-(Nervenwachstumsfaktor)-Rezeptorsuperfamilie und bindet während der Antigenpräsentation an den CD40-Liganden auf B-Lymphozyten. Dadurch werden die ruhenden B-Zellen stimuliert. CD40 wird auf B-Lymphozyten, Makrophagen und DC exprimiert. Eine Bindung von CD40 an den CD40-L induziert eine Zytokinproduktion von Makrophagen und DC.

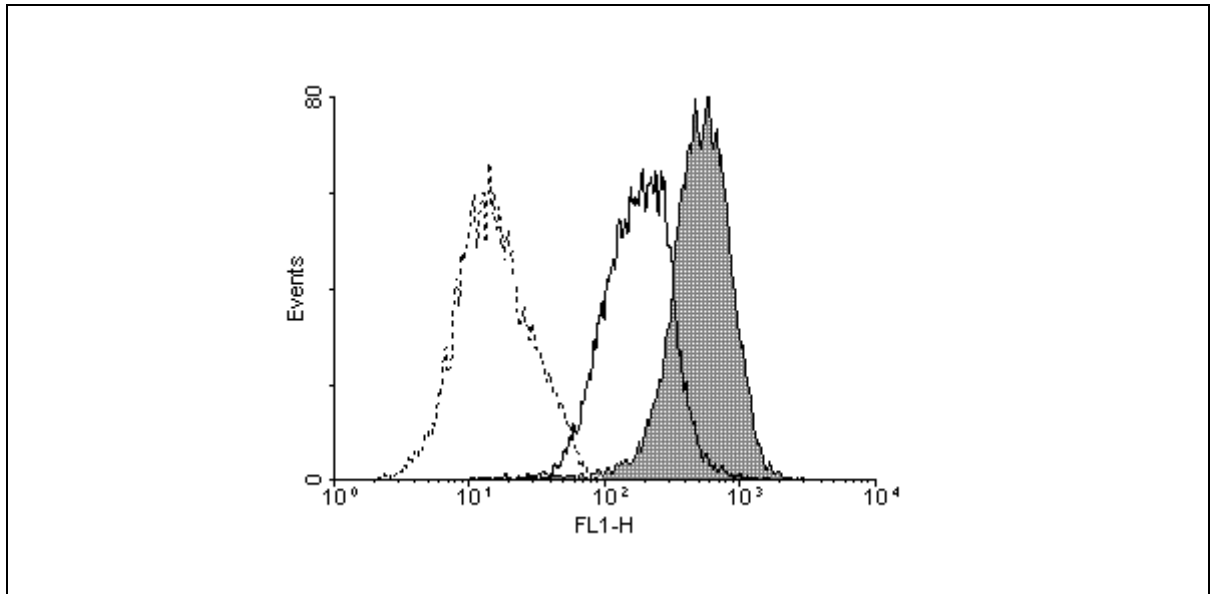


Abb.31: Anstieg der CD40 Expression bei DC nach IL-16 Stimulation. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der Simultestkontrolle (gepunktete Linie), der unstimulierten DC (durchgehende Linie) und IL-16 stimulierter DC (grau ausgefüllte Linie).

In der Abbildung 31 sind die Fluoreszenzintensitäten der an CD40 gekoppelten Antikörper von unstimulierten, mit IL-16 stimulierten DC sowie die Simultestkontrolle dargestellt. CD40 wurde auf unstimulierten DC exprimiert. Durch die Stimulation mit IL-16 wurde die CD40 Expression auf DC deutlich erhöht.

## CD54 Expression

CD54 ist das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1 und ein Protein der Immunglobolinsuperfamilie. Es ist ein Ligand für Leukozytenintegrine. CD54 spielt eine wichtige Rolle bei der Bindung von Lymphozyten an bestimmte Zellen, wie z.B. antigenpräsentierende Zellen wie DC und Endothelzellen.

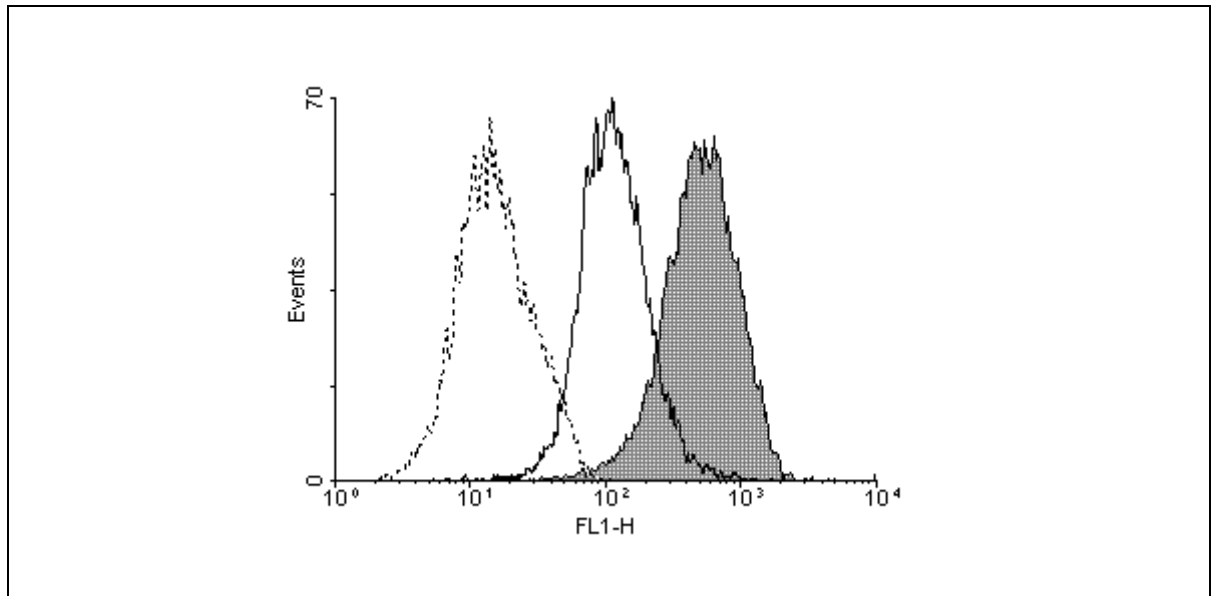


Abb.32: Anstieg der CD54 Expression bei DC nach IL-16 Stimulation. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der Simultestkontrolle (gepunktete Linie), der unstimulierten DC (durchgehende Linie) und IL-16 stimulierter DC (grau ausgefüllte Linie).

In der Abbildung 32 sind die Fluoreszenzintensitäten der an CD54 gekoppelten Antikörper von unstimulierten, mit IL-16 stimulierten DC sowie die Simultestkontrolle dargestellt. CD54 wurde auf unstimulierten DC exprimiert. Durch die Stimulation mit IL-16 wurde die CD54 Expression auf DC deutlich erhöht.



### CD83 Expression

Die Expression von CD83 nimmt während der Ausreifung von DC zu. CD83 spielt eine Rolle bei der Aktivierung von B-Zellen durch DC.

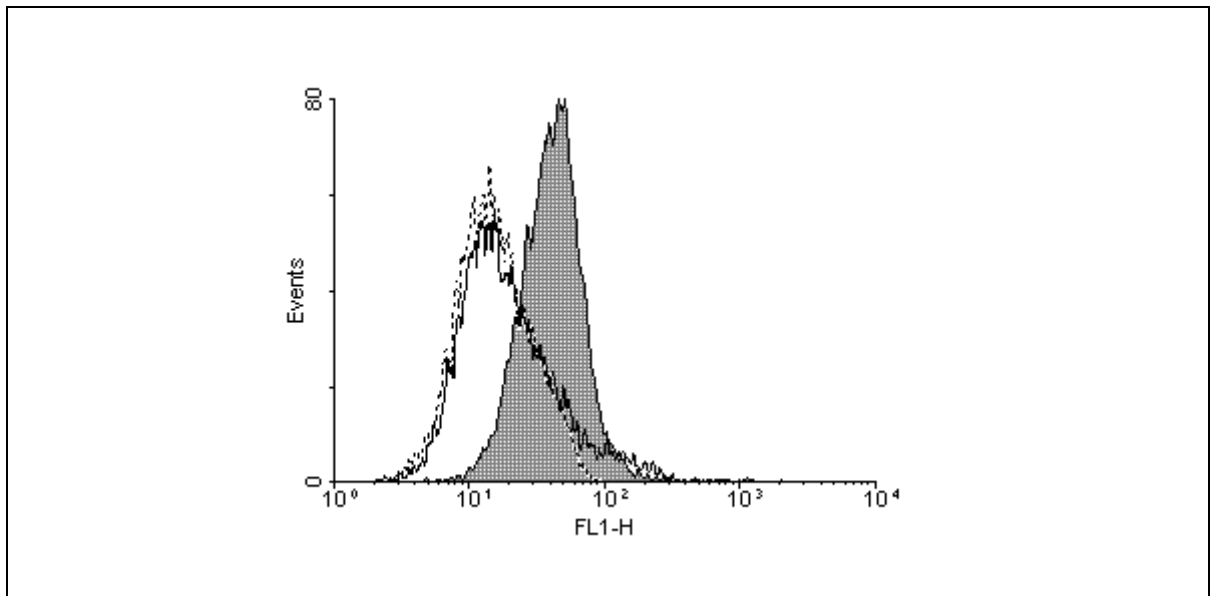


Abb.33: Anstieg der CD83 Expression bei DC nach IL-16 Stimulation. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der Simultestkontrolle (gepunktete Linie), der unstimulierten DC (durchgehende Linie) und IL-16 stimulierter DC (grau ausgefüllte Linie).

In der Abbildung 33 sind die Fluoreszenzintensitäten der an CD83 gekoppelten Antikörper von unstimulierten, mit IL-16 stimulierten DC sowie die Simultestkontrolle dargestellt. CD83 war auf unstimulierten DC gar nicht oder nur sehr wenig vorhanden. Durch die Stimulation mit IL-16 nahm die Expression von CD83 auf DC stark zu.

### CD86 Expression

Die Expression von CD86 nimmt während der Differenzierung von Monozyten zu DC zu. Die Funktion von CD86 ist noch nicht ganz klar, es spielt aber möglicherweise eine Rolle bei der T-Zell-Stimulation.

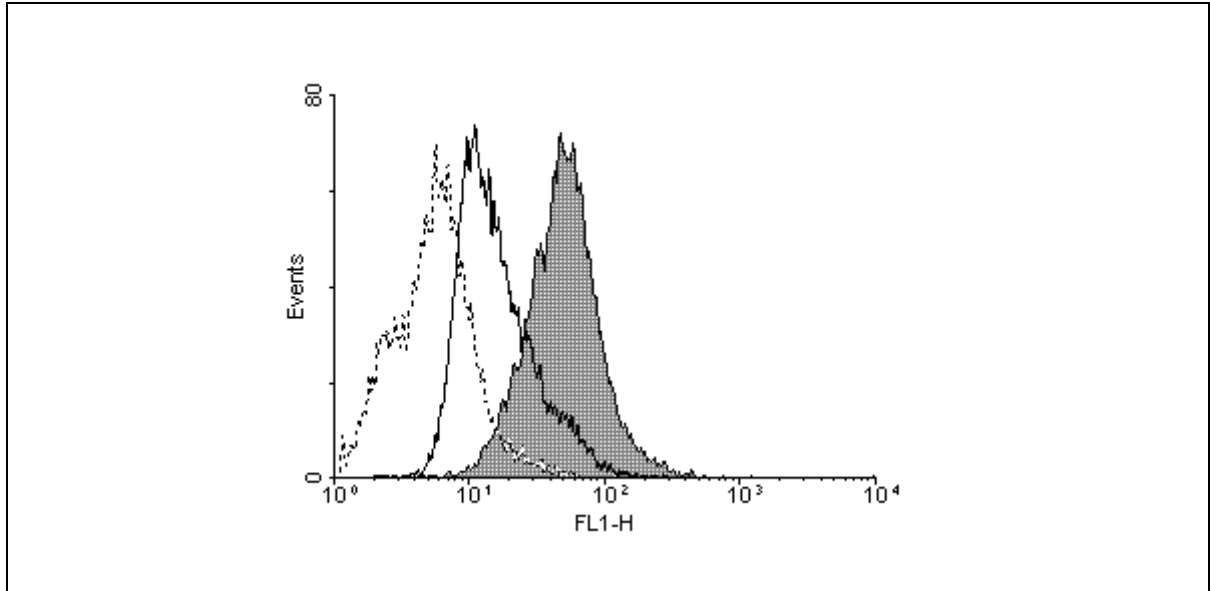


Abb.34: Anstieg der CD86 Expression bei DC nach IL-16 Stimulation. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der Simultestkontrolle (gepunktete Linie), der unstimulierten DC (durchgehende Linie) und IL-16 stimulierter DC (grau ausgefüllte Linie).

In der Abbildung 34 sind die Fluoreszenzintensitäten der an CD86 gekoppelten Antikörper von unstimulierten, mit IL-16 stimulierten DC sowie die Simultestkontrolle dargestellt. CD86 wurde auf unstimulierten DC exprimiert. Durch die Stimulation mit IL-16 wurde die CD86 Expression auf DC deutlich erhöht.

## HLA-DR Expression

HLA (Humanes Leukozyten Antigen) ist die genetische Bezeichnung für den menschlichen MHC (Haupthistokompatibilitätskomplex). HLA-DR ist wichtig für die Antigenpräsentationen. Kleine Proteinfragmente werden mit Hilfe von HLA-DR den T-Zellen präsentiert. Während der Differenzierung und Ausreifung der DC steigt die Expression der HLA-DR Moleküle an.

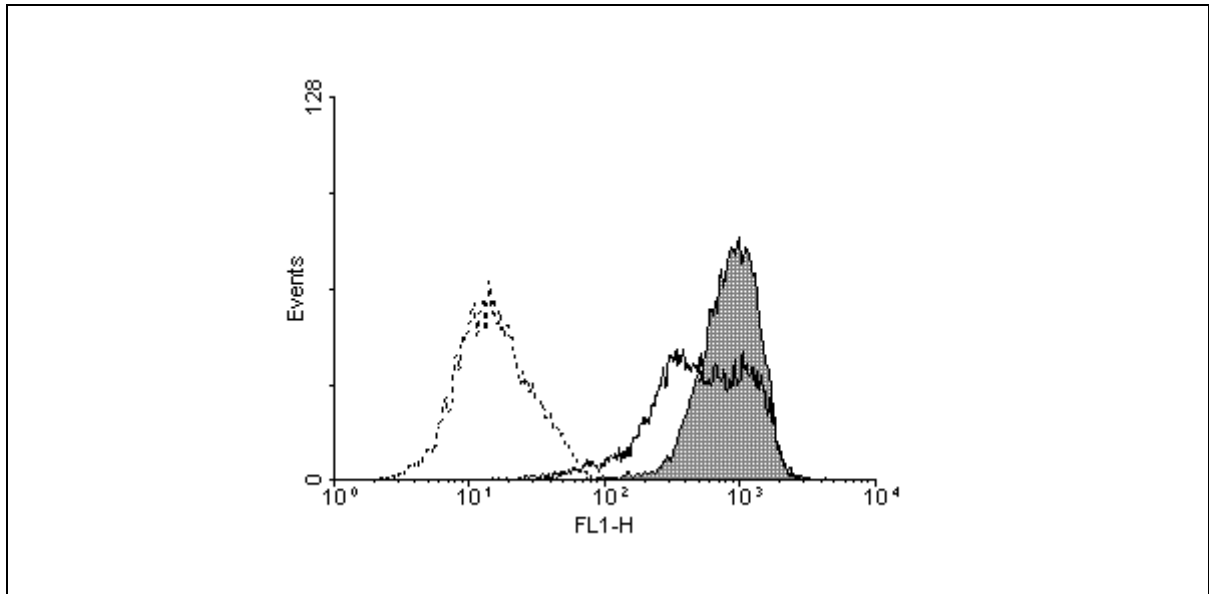


Abb.35: Anstieg der HLA-DR Expression bei DC nach IL-16 Stimulation. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der Simultestkontrolle (gepunktete Linie), der unstimulierten DC (durchgehende Linie) und IL-16 stimulierter DC (grau ausgefüllte Linie).

In der Abbildung 35 sind die Fluoreszenzintensitäten der an HLA-DR gekoppelten Antikörper von unstimulierten, mit IL-16 stimulierten DC sowie die Simultestkontrolle dargestellt.

HLA-DR wurde auf unstimulierten DC exprimiert. Durch die Stimulation mit IL-16 wurde die HLA-DR Expression auf DC deutlich erhöht.

### 3.5.2 Proliferationstest: MLR (mixed lymphocyte reaction)

Ziel dieses Versuchs war es, die Funktionalität der DC zu bestimmen. DC sind die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems. Nur DC sind in der Lage naive T-Lymphozyten zu aktivieren. Dabei ist die Aktivierungsfähigkeit der DC abhängig von ihrem Reifegrad. Ausgereifte DC können T-Lymphozyten viel stärker aktivieren als unreife DC. In der mixed lymphocyte reaction wurden allogene T-Lymphozyten 5 Tage mit unreifen oder IL-16 stimulierten DC kultiviert und anschließend wurde für 24h radioaktiv

markiertes  $^3\text{H}$  Thymidin. zugegeben. Der Einbau des  $^3\text{H}$  Thymidin in die T-Zellen wurde gemessen und so konnte eine Aussage über die Proliferation und damit die Aktivierung der T-Zellen durch die DC getroffen werden. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 36 dargestellt.

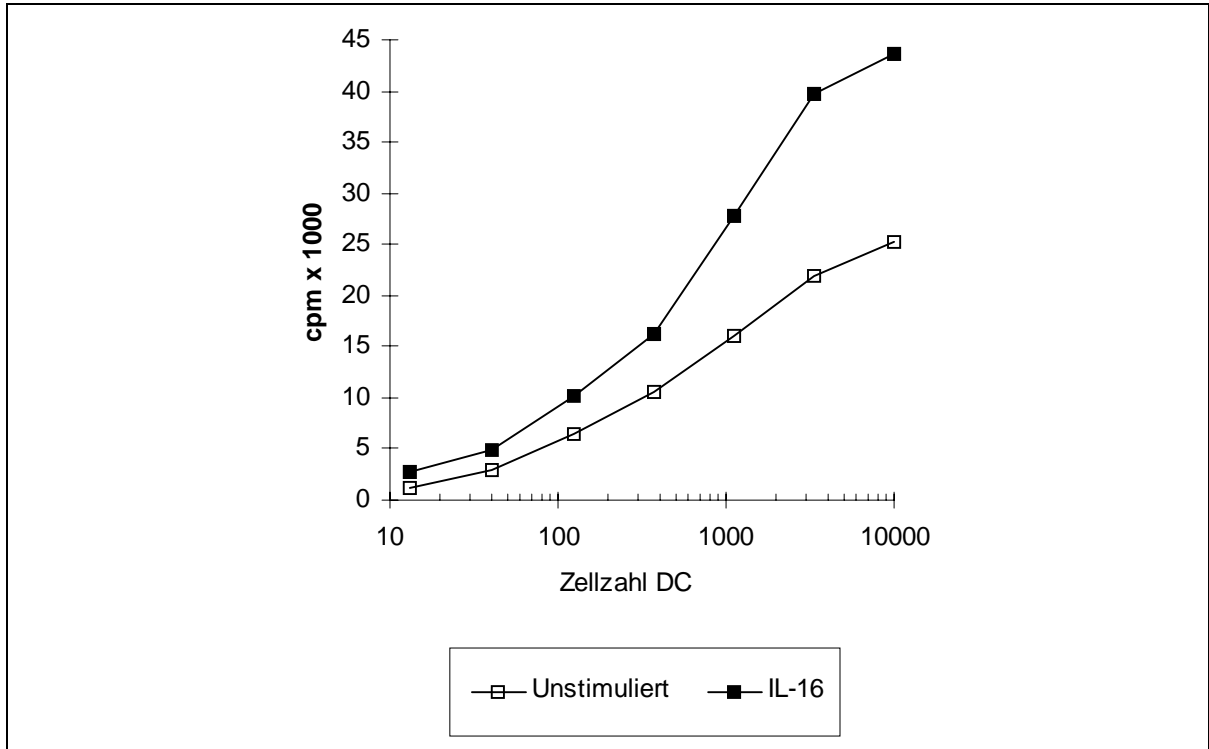


Abb.36: Vergleich der MLR mit unstimulierten und IL-16 stimulierten DC. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 Versuchen. Es wurden  $1 \times 10^5$  Lymphozyten/ml sowie DC in den Konzentrationen  $1 \times 10^4$ ,  $3,3 \times 10^3$ ,  $1,1 \times 10^3$ , 370, 123, 41, 13 Zellen/ml eingesetzt.

Die aus Monozyten generierten DC waren in der Lage allogene T-Lymphozyten zu aktivieren. Die gemessene Radioaktivität stieg mit Zunahme der DC Anzahl. Je mehr DC im Verhältnis zu T-Lymphozyten vorhanden waren, desto mehr Radioaktivität konnte in dem Versuchsansatz nachgewiesen werden, d.h. die Proliferation der T-Zellen war stärker. Daneben gab es auch Unterschiede zwischen unbehandelten und mit IL-16 stimulierten DC. Die mit IL-16 stimulierten DC konnten T-Lymphozyten stärker aktivieren, als unbehandelte DC, was durch einen doppelt so hohen Einbau von  $^3\text{H}$  Thymidin gezeigt wurde. Es konnte mit diesem Versuch gezeigt werden, dass die mit IL-16 stimulierten DC einen höheren Reifegrad besaßen als die unbehandelten DC.

### 3.5.3 Einfluss von IL-16 auf die Induktion verschiedener Zytokin- und Chemokingene

Die DC wurden zusätzlich auf die Induktion verschiedener Zytokin- und Chemokingene untersucht. Dafür wurde die RNA aus den Zellen von jeweils 5 Spendern isoliert und ein RNase Protection-Assay der Firma PharMingen durchgeführt. Es wurden zwei verschiedene Kits verwendet. Im ersten wurde die Expression der Zytokine IL-12p35, IL-12p40, IL-10, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-6, IFN- $\gamma$  sowie der beiden Housekeeping Gene L32 und GAPDH bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Instant Imagers.

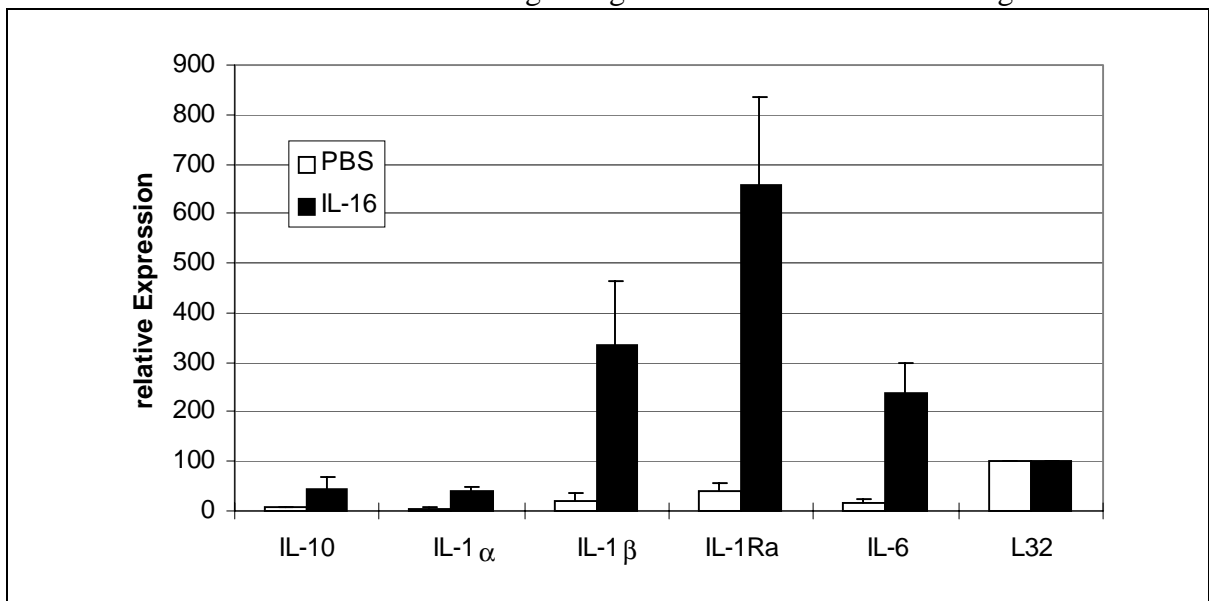


Abb.37: Genexpression von IL-10, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra und IL-6 durch DC. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Zytokinexpression des RPA von 5 Spendern. Die DC wurden für 18h mit IL-16 (1 $\mu$ g/ml) kultiviert. Es wurden 5 $\mu$ g RNA eingesetzt.

Die Zytokingene IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL10 und IL-6 wurden in unstimulierten DC nur schwach exprimiert. Nach Stimulation mit IL-16 konnte von allen Zytokinen eine erhöhte mRNA Menge in den Zellen gefunden werden. Dabei war die mRNA Menge von IL-10 und IL-1 $\alpha$  am niedrigsten, IL-6 und IL-1 $\beta$  wurden ca. sechsmal stärker exprimiert. Die Konzentration der IL-1Ra mRNA war in den Zellen am höchsten. IL-12p35, IL-12p40 sowie IFN- $\gamma$  konnten nicht nachgewiesen werden.

In einem zweiten Versuch wurde die Expression der Chemokingene Ltn, RANTES, IP-10, MIP-1 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, IL-8, I-309 sowie der Housekeepinggene L32 und GAPDH analysiert.

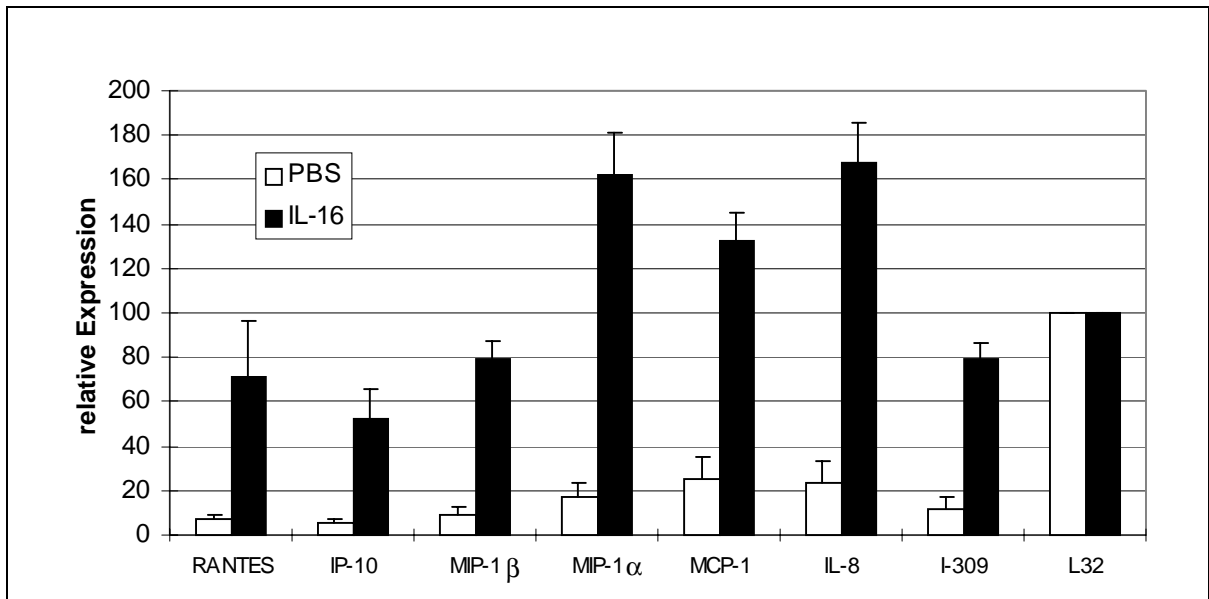


Abb.38: Genexpression von RANTES, IP-10, MIP-1 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, IL-8 und I-309 durch DC. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Zytokinexpression des RPA von 5 Spendern. Die DC wurden für 18h mit IL-16 (1 $\mu$ g/ml) kultiviert. Es wurden 5 $\mu$ g RNA eingesetzt.

Die Expression der Chemokine RANTES, IP-10, MIP- $\beta$ , MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, IL-8 und I-309 war nach Stimulation der DC mit IL-16 erhöht. In den unstimulierten DC war nur eine sehr geringe Menge an mRNA dieser Gene vorhanden. Die vermehrte Geninduktion nach IL-16 Stimulation war jedoch bei den unterschiedlichen Chemokinen verschieden stark. IL-8, MIP-1 $\alpha$  und MCP-1 wurden am stärksten hochreguliert, während von RANTES, MIP-1 $\beta$ , IP-10 und I-309 nur ungefähr die Hälfte an mRNA detektiert werden konnte. Ltn konnte weder in unbehandelten noch mit IL-16 stimulierten DC nachgewiesen werden.

#### 3.5.4 Einfluss von IL-16 auf die Zytokin- und Chemokinproduktion bei DC

DC sind in der Lage verschiedene Chemokine und Zytokine zu produzieren. Nachdem im RPA die Induktion einiger Zytokin- und Chemokingene durch IL-16 nachgewiesen werden konnte, wurden die Überstände untersucht. Die Konzentrationen der verschiedenen Zytokine und Chemokine wurde mittels ELISA bestimmt. Die Rolle im Immunsystem und die biologischen Funktionen der einzelnen Zytokine und Chemokine wurden unter 3.5.1-3.5.2 beschrieben.

### 3.5.4.1 Zytokinproduktion

#### IL-1

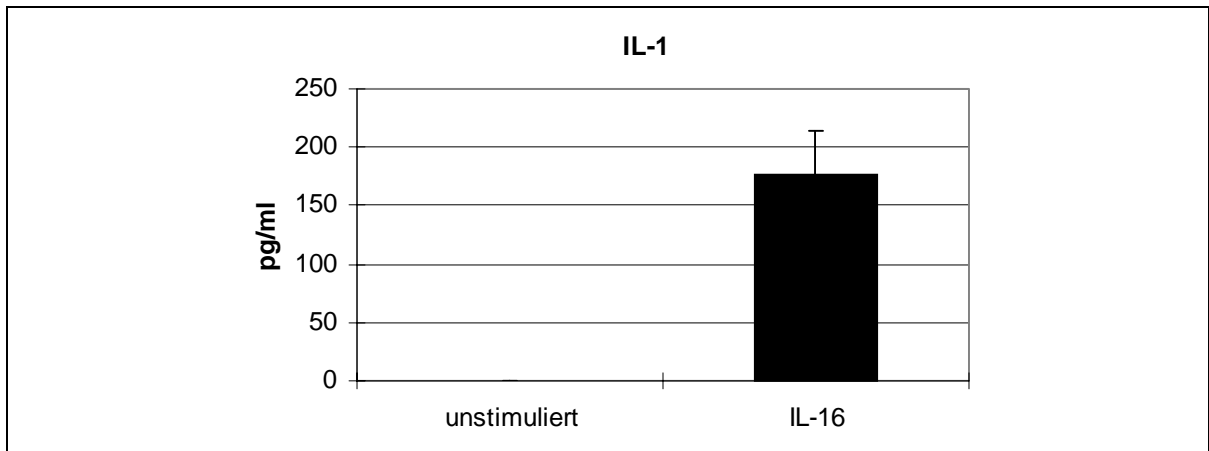


Abb.38: Einfluss von IL-16 auf die IL-1 Produktion bei DC. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen der IL-1 Konzentration in den Überständen von unstimulierten oder mit IL-16 (1 $\mu$ g/ml) stimulierten DC von 8 Spendern.

Unstimulierte DC produzierten kein IL-1. Nach Stimulation mit IL-16 war die Konzentration von IL-1 in den Überständen deutlich erhöht. Die Konzentration betrug 170 pg/ml.

#### IL-6

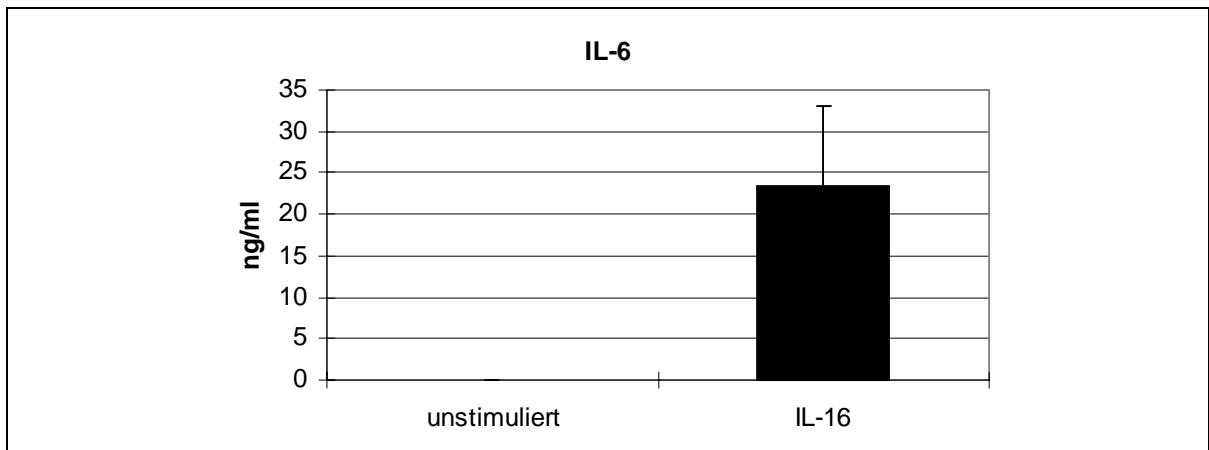


Abb.39: Einfluss von IL-16 auf die IL-6 Produktion bei DC. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen der IL-6 Konzentration in den Überständen von unstimulierten oder mit IL-16 (1 $\mu$ g/ml) stimulierten DC von 8 Spendern.

Unstimulierte DC produzierten kein oder nur sehr wenig IL-6. Die Konzentration betrug 28 pg/ml. Nach Stimulation mit IL-16 war die Konzentration von IL-6 in den Überständen deutlich erhöht. Die Konzentration betrug 24 ng/ml.

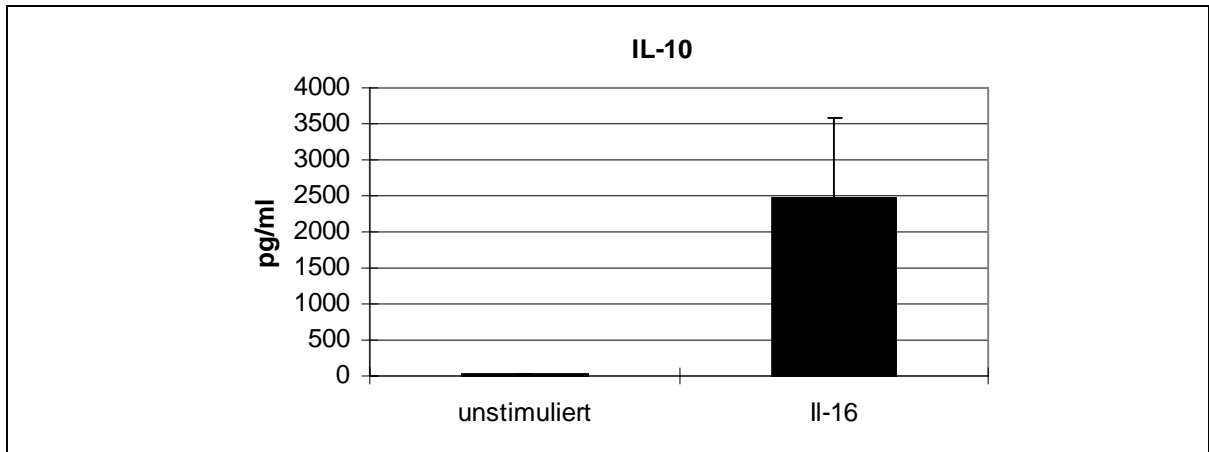
**IL-10**

Abb.40: Einfluss von IL-16 auf die IL-10 Produktion bei DC. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen der IL-10 Konzentration in den Überständen von unstimulierten oder mit IL-16 (1µg/ml) stimulierten DC von 8 Spendern.

Unstimulierte DC produzierten kein oder nur sehr wenig IL-10. Die Konzentration betrug 14 pg/ml. Nach Stimulation mit IL-16 war die Konzentration von IL-10 in den Überständen deutlich erhöht. Die Konzentration betrug 2230 pg/ml.

**IL-12**

IL-12 ist ein wichtiges Zytokin zur Charakterisierung reifer, aktivierter DC. IL-12 produzierende DC gehören zu den DC1-Zellen, während DC die nur sehr wenig oder gar kein IL-12 produzieren als DC2 oder DC3 bezeichnet werden.

Ein Nachweis von IL-12 mittels ELISA war nicht möglich, d.h. unstimulierte sowie mit IL-16 stimulierte DC produzierten kein IL-12. Da kein IL-12 detektiert werden konnte, wurde hier auf eine Abbildung verzichtet.



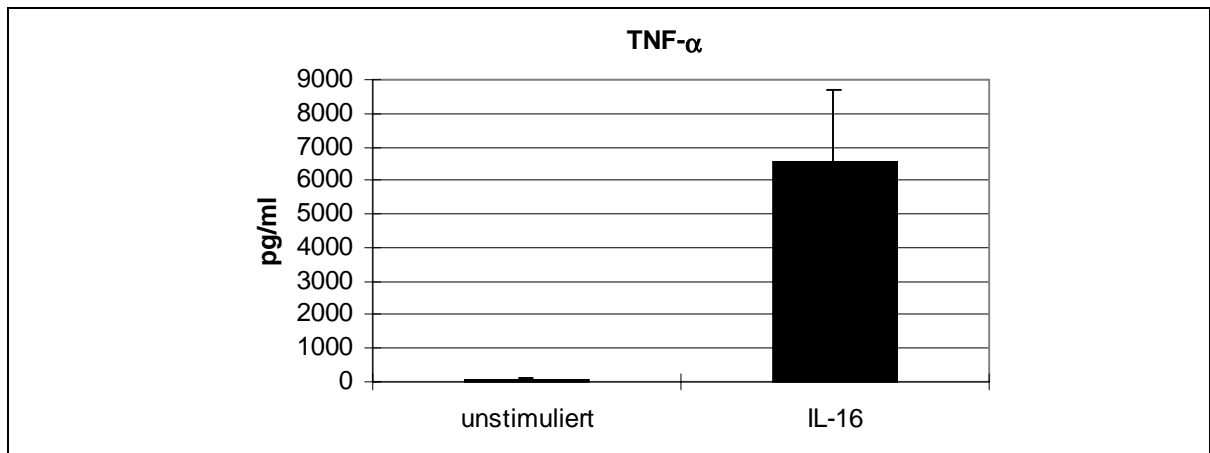
**TNF- $\alpha$** 

Abb.41: Einfluss von IL-16 auf die TNF- $\alpha$  Produktion bei DC. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen der TNF- $\alpha$  Konzentration in den Überständen von unstimulierten oder mit IL-16 (1 $\mu$ g/ml) stimulierten DC von 8 Spendern.

Unstimulierte DC produzierten kein oder nur sehr wenig TNF- $\alpha$ . Die Konzentration betrug 63 pg/ml. Nach Stimulation mit IL-16 war die Konzentration von TNF- $\alpha$  in den Überständen deutlich erhöht. Die Konzentration betrug 6500 pg/ml.

### 3.5.4.2 Chemokinproduktion

#### RANTES

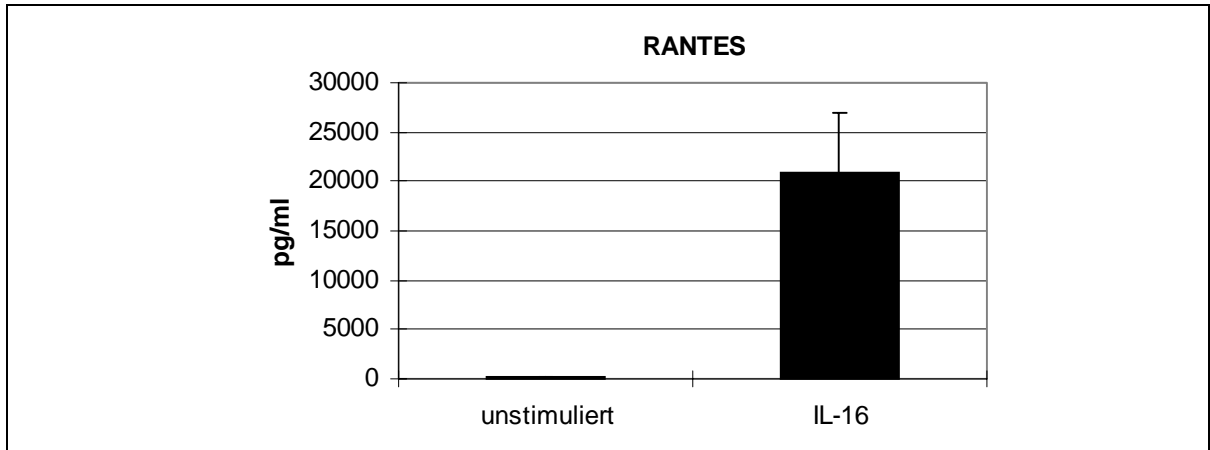


Abb.42: Einfluss von IL-16 auf die RANTES Produktion bei DC. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen der RANTES Konzentration in den Überständen von unstimulierten oder mit IL-16 (1 $\mu$ g/ml) stimulierten DC von 8 Spendern.

Unstimulierte DC produzierten kein oder nur sehr wenig RANTES. Die Konzentration betrug 100 pg/ml. Nach Stimulation mit IL-16 war die Konzentration von RANTES in den Überständen deutlich erhöht. Die Konzentration betrug 20 ng/ml.

#### IL-8

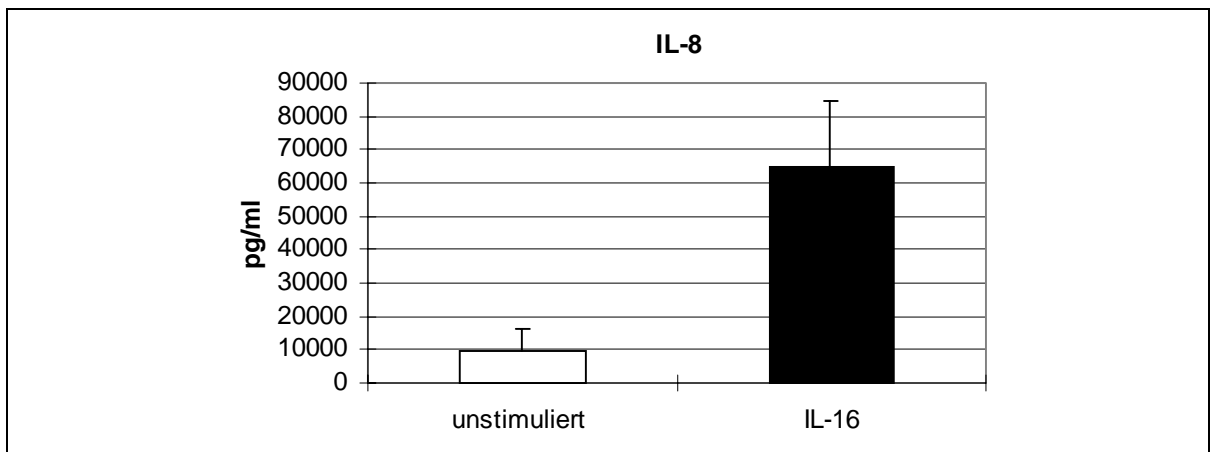


Abb.43: Einfluss von IL-16 auf die IL-8 Produktion bei DC. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen der IL-8 Konzentration in den Überständen von unstimulierten oder mit IL-16 (1 $\mu$ g/ml) stimulierten DC von 8 Spendern.

Unstimulierte DC produzierten IL-8. Die Konzentration betrug 9 ng/ml. Nach Stimulation mit IL-16 war die Konzentration von IL-8 in den Überständen deutlich erhöht. Die Konzentration betrug 64 ng/ml.

## MCP-1

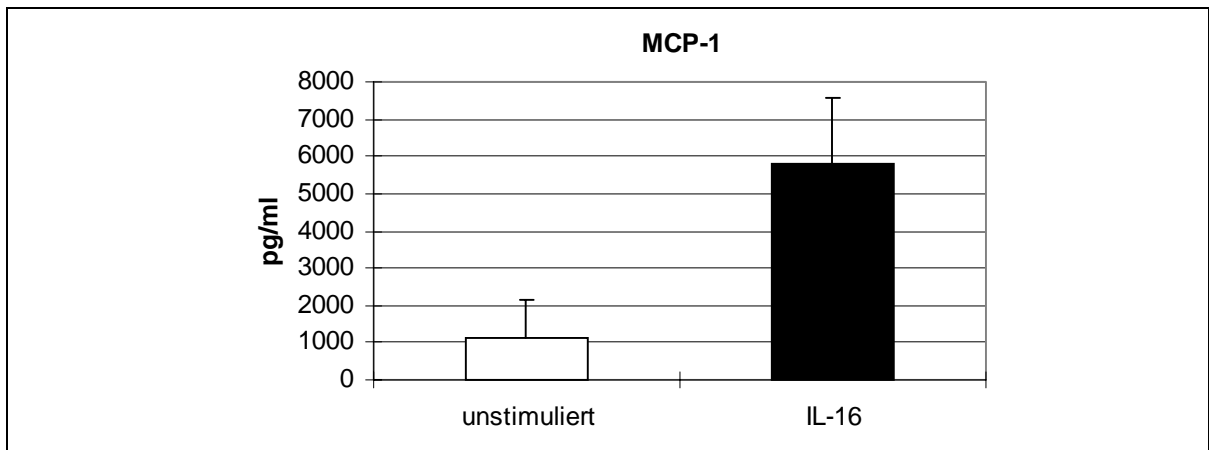


Abb.44: Einfluss von IL-16 auf die MCP-1 Produktion bei DC. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen der MCP-1 Konzentration in den Überständen von unstimulierten oder mit IL-16 (1 $\mu$ g/ml) stimulierten DC von 8 Spendern.

Unstimulierte DC produzierten MCP-1. Die Konzentration betrug 1 ng/ml. Nach Stimulation mit IL-16 war die Konzentration von MCP-1 in den Überständen deutlich erhöht. Die Konzentration betrug 5,8 ng/ml.

### 3.5.5 Chemotaktische Wirkung von IL-16 auf DC

DC wurden wie 2.15.4 beschrieben in einem Chemotaxis Versuch eingesetzt. Es sollte getestet werden, ob IL-16 chemotaktisch auf DC wirkt, wie dies schon für Monozyten gezeigt werden konnte.

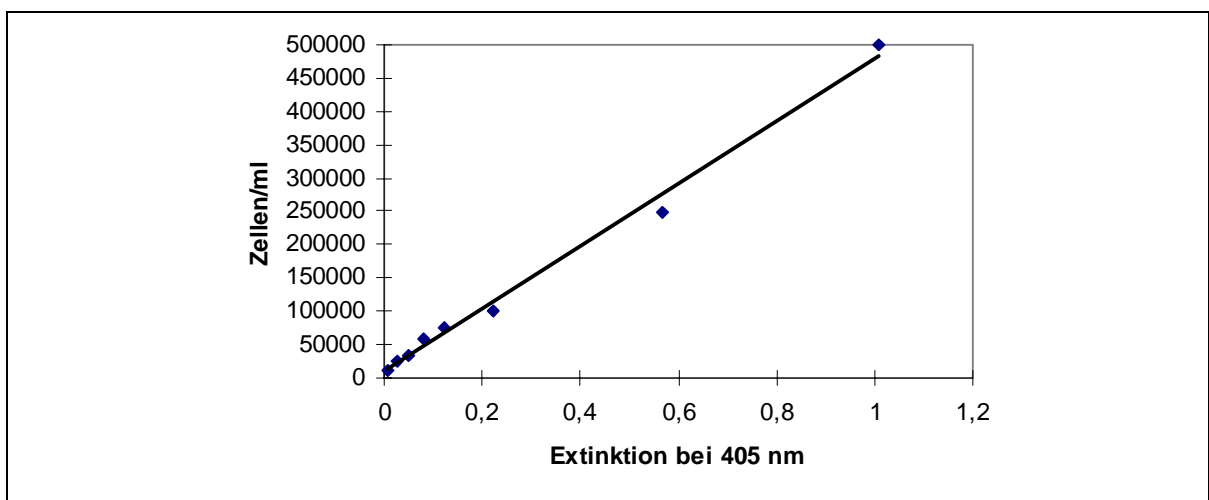


Abb.45: Eichreihe für die Zellzahlbestimmung der DC für die Chemotaxis

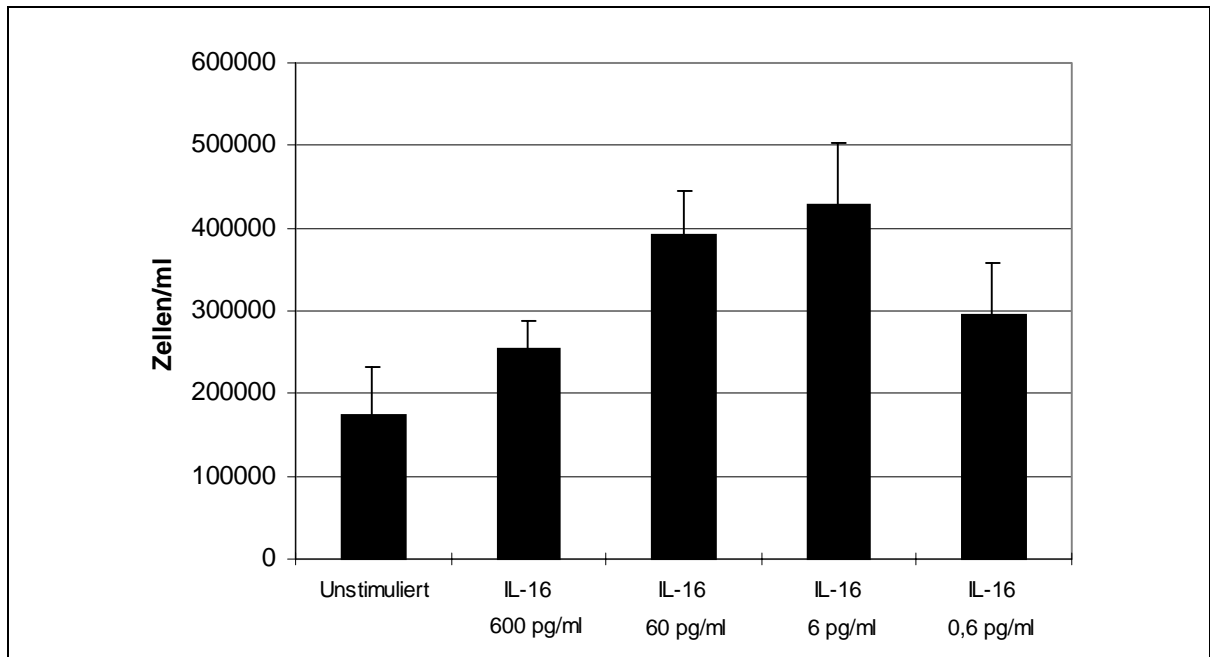


Abb.46: Chemotaxis DC. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Zellkonzentration in der unteren Kammer von jeweils 3 Spendern.

Für jede Probe wurde der chemotaktische Index bestimmt. Liegt dieser deutlich über 1,0 (1,5 und höher), so ist dieser Ansatz als chemotaktisch positiv zu bewerten. In der Tabelle 4 sind die Werte für den chemotaktischen Index der in Abbildung 46 dargestellten Proben eingetragen.

<u>Chemotaktischer Index</u>		
IL-16	600pg/ml	1,2
	60pg/ml	2,1
	6pg/ml	2,3
	0,6pg/ml	1,6

Tab.4: Chemotaktischer Index der Proben des DC-Chemotaxis-Versuchs

IL-16 wirkte chemotaktisch auf DC. Dabei war die Wirkung konzentrationsabhängig. Bei 600 pg/ml IL-16 konnte nur eine geringe chemotaktische Aktivität festgestellt werden. Der chemotaktische Index von 1,2 war sehr klein. Die IL-16 Konzentrationen 60 pg/ml, 6 pg/ml und 0,6 pg/ml zeigten eindeutig eine chemotaktische Wirkung. Der chemotaktische Index lag bei allen drei Konzentrationen über 1,5, wobei die stärkste chemotaktische Wirkung bei einer IL-16 Konzentration von 6 pg/ml (chemotaktischer Index: 2,3) gezeigt werden konnte, d.h. hier waren mehr als doppelt so viele DC von der oberen in die untere Kammer gewandert als bei der Mediumkontrolle. Die höhere (60 pg/ml) und niedrigere (0,6 pg/ml) IL-16 Konzentration wirkten weniger chemotaktisch auf DC.

### **3.6 Kultur von DC mit einem TNF- $\alpha$ Antikörper**

DC sezernieren nach Zugabe von IL-16 TNF- $\alpha$ . Die alleinige Kultur von unreifen DC mit TNF- $\alpha$  führt zu einer Ausreifung der Zellen. In diesem Versuchsansatz soll gezeigt werden, dass die Aktivierung und Reifung von DC durch IL-16 unabhängig von dem freigesetzten TNF- $\alpha$  ist. Dafür wurde der Kultur ein TNF- $\alpha$  Antikörper zugesetzt, der die biologische Aktivität von TNF- $\alpha$  hemmen sollte.

DC wurden aus Monozyten durch Zugabe von GM-CSF und IL-4 generiert. An Tag 7 der Kultur wurde IL-16 zur Aktivierung der Zellen zugegeben. Die Wirkung des daraufhin sezernierten TNF- $\alpha$  wurde durch die Zugabe eines TNF- $\alpha$  AK gehemmt. Als Positivkontrolle dienten mit TNF- $\alpha$  stimulierte DC. Auch zu dieser Kultur wurde der TNF- $\alpha$ -AK gegeben, um die Hemmung der biologischen Aktivität von TNF- $\alpha$  durch diesen AK zu zeigen. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte DC.

#### **3.6.1 Einfluss des TNF- $\alpha$ AK auf die Expression verschiedener Oberflächenantigene**

Nach Stimulation mit IL-16 werden bestimmte Oberflächenantigene wie z.B. CD40, CD83 und CD86 stärker auf DC exprimiert als auf unbehandelten unreifen DC. Ein ähnlicher Anstieg der Expression dieser Oberflächenmoleküle kann durch die Zugabe von TNF- $\alpha$  erreicht werden. Die DC wurden wie unter 3.9 beschrieben mit IL-16 bzw. TNF- $\alpha$  stimuliert und zusätzlich wurde ein TNF- $\alpha$  neutralisierender AK zu der Kultur gegeben. Die Zellen wurden nach 18h entnommen und auf die Expression von CD40, CD83 und CD86 im ELISA untersucht.

### CD40

CD40 ist ein Aktivierungsmarker für DC und die Expression nimmt mit dem Reifungsgrad der DC zu.

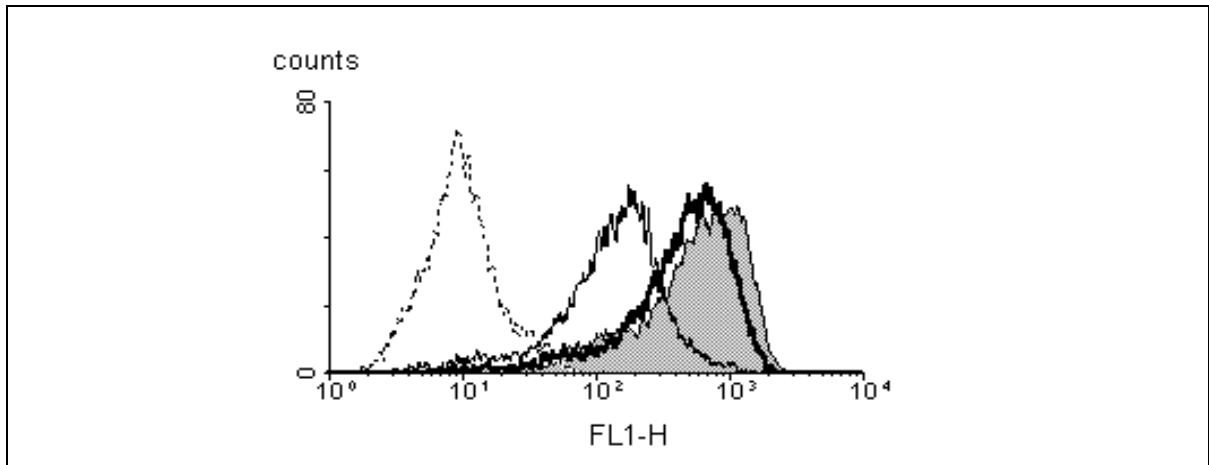


Abb.47: CD40 Expression. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der Simultestkontrolle (gepunktete Linie), der unstimulierten DC (dünne Linie), der IL-16 stimulierten DC (grau ausgefüllte Linie) und mit IL-16 und TNF- $\alpha$  AK kultivierten DC (dicke Linie).

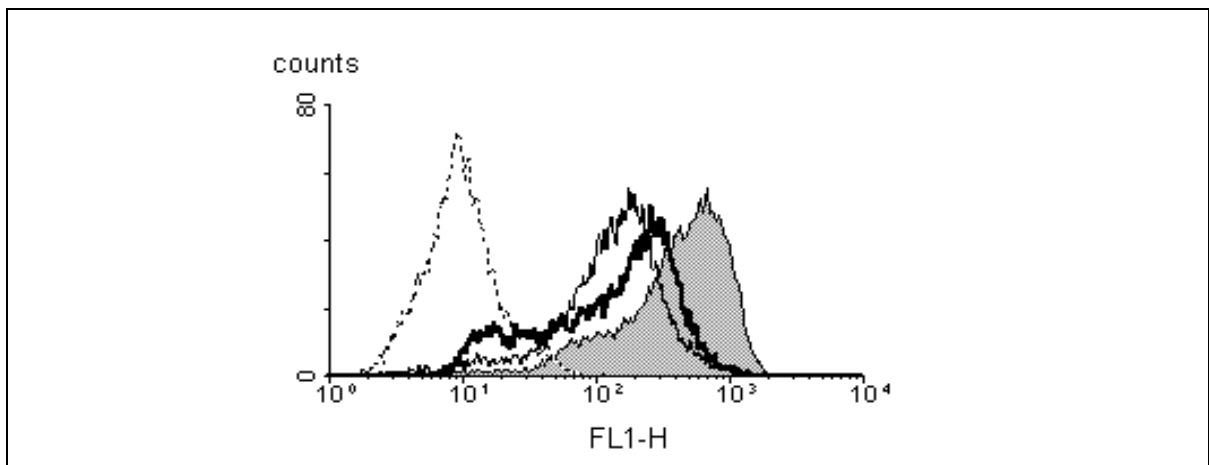


Abb.48: CD40 Expression. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der Simultestkontrolle (gepunktete Linie), der unstimulierten DC (dünne Linie), der TNF- $\alpha$  stimulierten DC (grau ausgefüllte Linie) und mit TNF- $\alpha$  und TNF- $\alpha$  AK kultivierten DC (dicke Linie).

Unbehandelte DC exprimierten wenig CD40. Nach Stimulation mit IL-16 oder TNF- $\alpha$  nahm die Expression von CD40 auf der Zellmembran stark zu. Bei gleichzeitiger Zugabe von TNF- $\alpha$  und den TNF- $\alpha$  AK unterschied sich die CD40Expression nicht von der unbehandelter DC, während die gleichzeitige Zugabe dieses Antikörpers zusammen mit IL-16 zu einer gleich starken CD40 Expression führte wie die Zugabe von IL-16 alleine. IL-16 selbst führte hier unabhängig von TNF- $\alpha$  zu einer Expressionserhöhung von CD40.

### CD83

CD83 ist ein Aktivierungsmarker für DC und die Expression nimmt mit dem Reifungsgrad der DC zu.

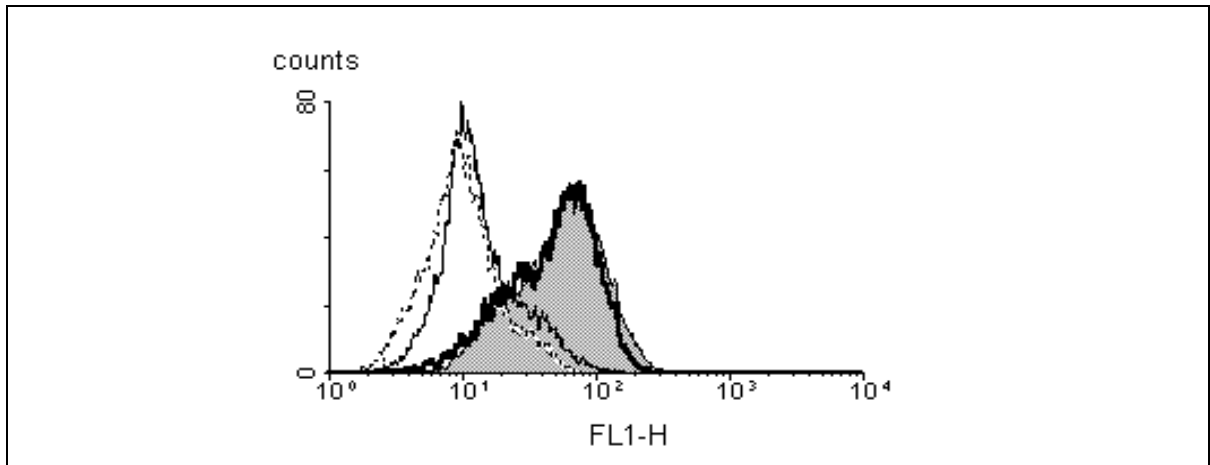


Abb.49: CD83 Expression. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der Simultestkontrolle (gepunktete Linie), der unstimulierten DC (dünne Linie), der IL-16 stimulierten DC (grau ausgefüllte Linie) und mit IL-16 und TNF- $\alpha$  AK kultivierten DC (dicke Linie).

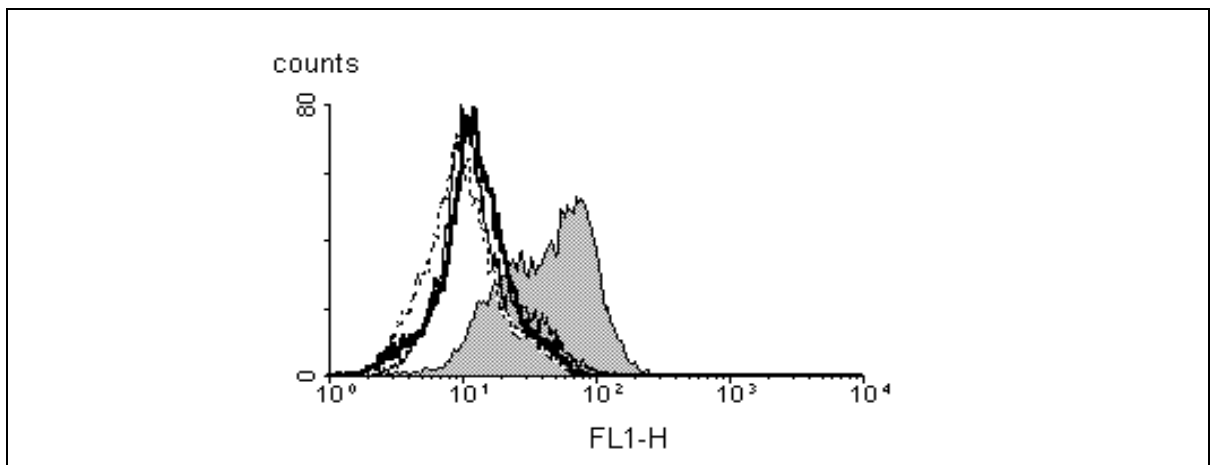


Abb.50: CD83 Expression. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der Simultestkontrolle (gepunktete Linie), der unstimulierten DC (dünne Linie), der TNF- $\alpha$  stimulierten DC (grau ausgefüllte Linie) und mit TNF- $\alpha$  und TNF- $\alpha$  AK kultivierten DC (dicke Linie).

Unbehandelte DC exprimierten wenig CD83. Nach Stimulation mit IL-16 oder TNF- $\alpha$  nahm die Expression von CD83 auf der Zellmembran stark zu. Bei gleichzeitiger Zugabe von TNF- $\alpha$  und den TNF- $\alpha$  AK unterschied sich die CD83 Expression nicht von der unbehandelter DC, während die gleichzeitige Zugabe dieses Antikörpers zusammen mit IL-16 zu einer gleich starken CD83 Expression führte wie die Zugabe von IL-16 alleine. IL-16 selbst führte hier unabhängig von TNF- $\alpha$  zu einer Expressionserhöhung von CD83.

### CD86

CD86 ist ein Aktivierungsmarker für DC und die Expression nimmt mit dem Reifungsgrad der DC zu.

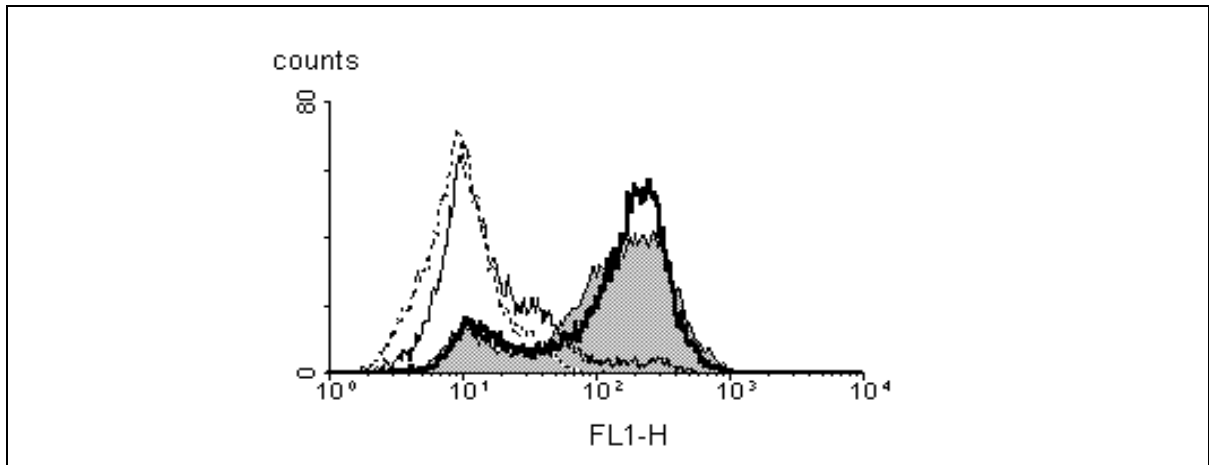


Abb.51: CD86 Expression. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der Simultestkontrolle (gepunktete Linie), der unstimulierten DC (dünne Linie), der IL-16 stimulierten DC (grau ausgefüllte Linie) und mit IL-16 und TNF- $\alpha$  AK kultivierten DC (dicke Linie).

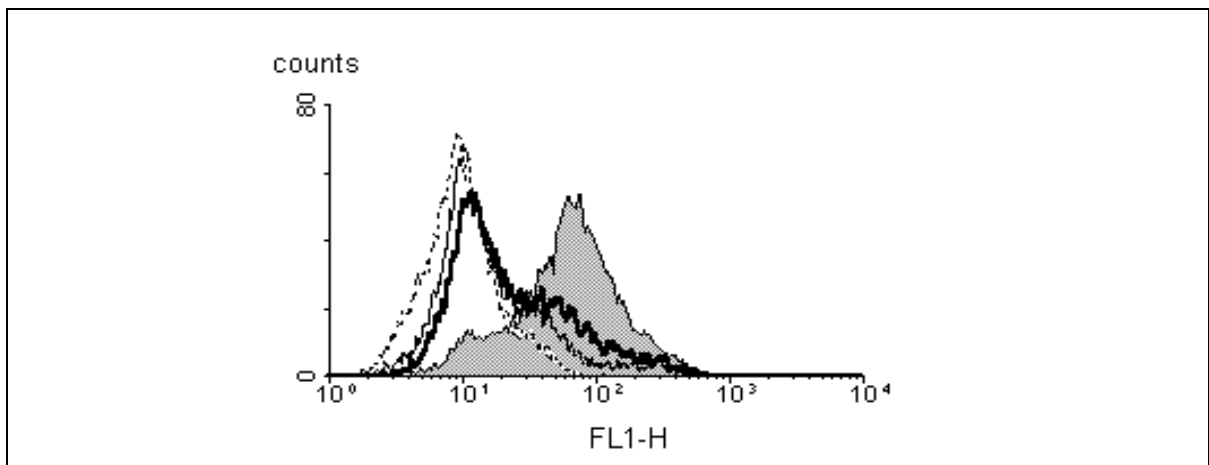


Abb.52: CD86 Expression. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der Simultestkontrolle (gepunktete Linie), der unstimulierten DC (dünne Linie), der TNF- $\alpha$  stimulierten DC (grau ausgefüllte Linie) und mit TNF- $\alpha$  und TNF- $\alpha$  AK kultivierten DC (dicke Linie).

Unbehandelte DC exprimierten wenig CD86. Nach Stimulation mit IL-16 oder TNF- $\alpha$  nimmt die Expression von CD86 auf der Zellmembran stark zu. Bei gleichzeitiger Zugabe von TNF- $\alpha$  und den TNF- $\alpha$  AK unterschied sich die CD86 Expression nicht von der unbehandelten DC, während die gleichzeitige Zugabe dieses Antikörpers zusammen mit IL-16 zu einer gleich starken CD86 Expression führte wie die Zugabe von IL-16 alleine. IL-16 selbst führe hier unabhängig von TNF- $\alpha$  zu einer Expressionserhöhung von CD86.



### 3.6.2 Nachweis von TNF- $\alpha$ und IL-10 im ELISA

Aktivierte DC sezernieren eine Reihe verschiedener Zytokine und Chemokine. Eine wichtige Rolle spielt dabei TNF- $\alpha$ , das sowohl unreife DC aktivieren kann, aber auch von diesen aktivierten reifen DC produziert wird. In diesem Versuch sollte gezeigt werden, dass in den Überständen von DC nach IL-16 bzw. TNF- $\alpha$  Stimulation kein TNF- $\alpha$  mehr nachgewiesen werden kann, wenn gleichzeitig ein TNF- $\alpha$  neutralisierender AK zu der Kultur zugegen wurde. Außerdem sollte die Wirkung dieses AK auf die Produktion von IL-10 getestet werden. Dieses Zytokin wird nach Stimulation von DC mit IL-16 oder TNF- $\alpha$  produziert. Dieser Versuch sollte klären, ob die Produktion von IL-10 nach IL-16 Stimulation unabhängig von TNF- $\alpha$  ist.

#### TNF- $\alpha$

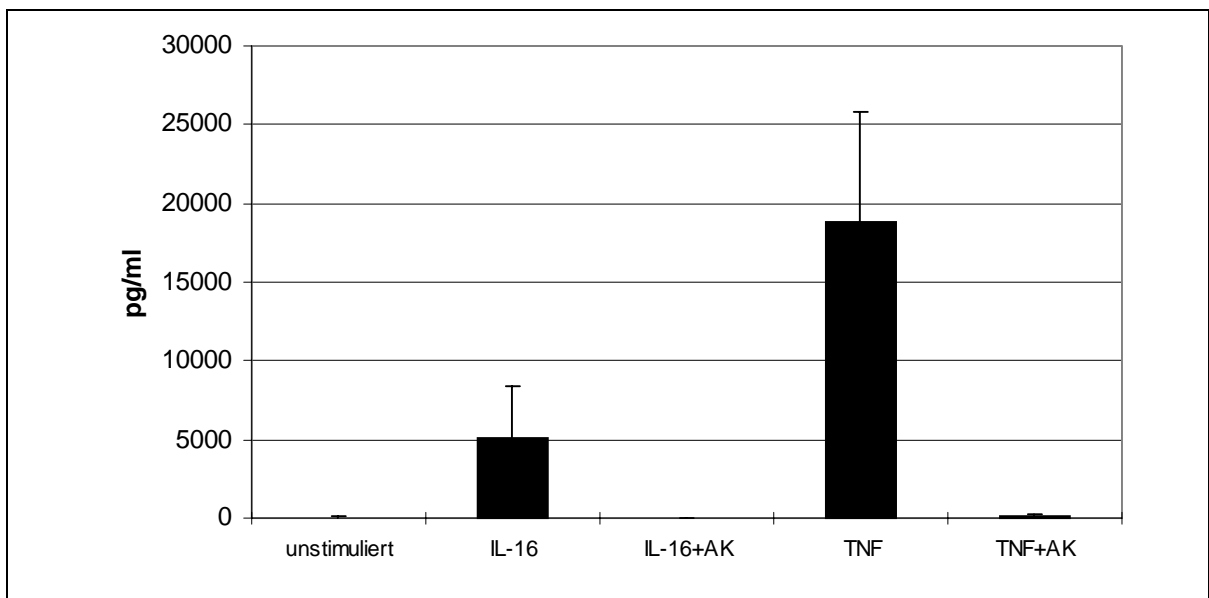


Abb.53: TNF- $\alpha$  Konzentration nach Zugabe eines TNF- $\alpha$  AK. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 Spendern.

Unstimulierte DC produzierten kein TNF- $\alpha$ . Nach Stimulation der Zellen mit IL-16 oder TNF- $\alpha$  konnte TNF- $\alpha$  in den Überständen detektiert werden. Die nachgewiesene TNF- $\alpha$  Menge in den Überständen der DC war nach TNF- $\alpha$  Stimulation höher als bei den IL-16 stimulierten DC. Nach Zugabe des TNF- $\alpha$  AK zu beiden Kulturen war kein TNF- $\alpha$  in den Überständen der Zellen nachweisbar, d.h. der TNF- $\alpha$  Antikörper hatte das zu der Kultur zugegebene oder von den Zellen nach IL-16 Stimulation produzierte TNF- $\alpha$  gebunden und es konnte so nicht mehr im ELISA detektiert werden.

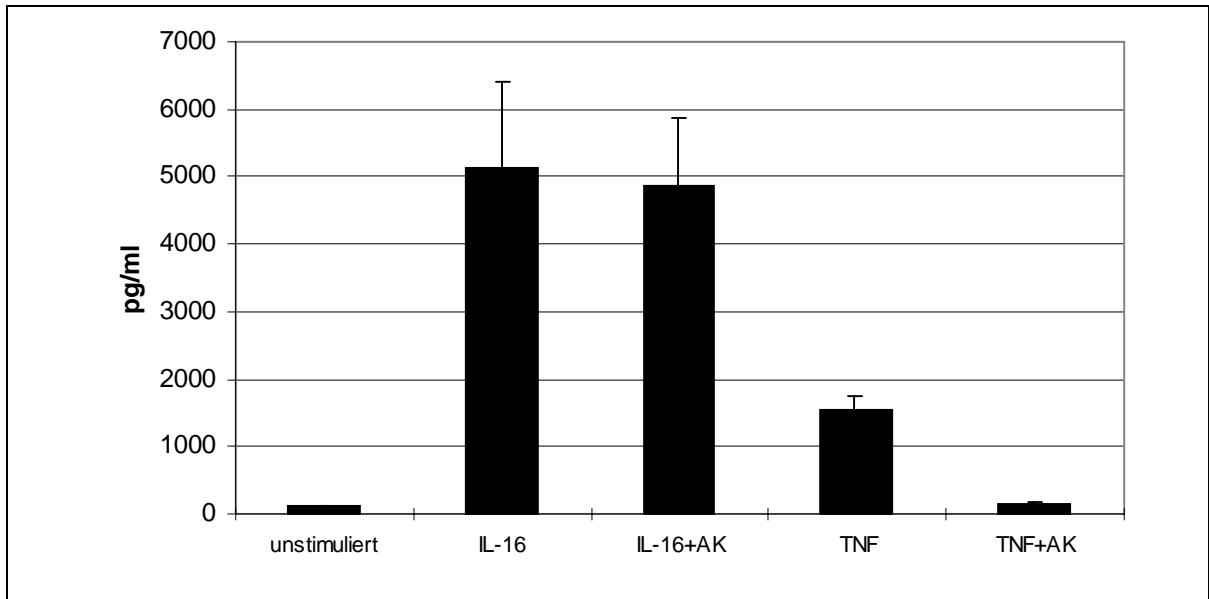
**IL-10**

Abb.54: TNF- $\alpha$  Konzentration nach Zugabe eines TNF- $\alpha$  AK. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 Spendern.

Die unstimulierten noch unreifen DC produzierten sehr wenig IL-10. Nach Stimulation der Zellen mit IL-16 konnte sehr viel IL-10 in den Überständen von DC nachgewiesen werden. Diese IL-10 Produktion der stimulierten DC konnte durch die Zugabe eines neutralisierenden TNF- $\alpha$  AK nicht verändert werden. Auch nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  produzierten die DC IL-10, jedoch nur ca. 1/3 der IL-10 Menge wie nach IL-16 Stimulation. Durch Zugabe des TNF- $\alpha$  neutralisierenden AK konnte die IL-10 Produktion der mit TNF- $\alpha$  behandelten DC auf den Level der unstimulierten DC gesenkt werden.

### 3.6.3 Einfluss des TNF- $\alpha$ AK auf die MLR

In diesem Versuch sollte gezeigt werden, dass die Funktionalität und damit die Fähigkeit der durch IL-16 aktivierten DC T-Zellen zu stimulieren unabhängig von TNF- $\alpha$  war. Es wurden unbehandelte, mit IL-16 bzw. TNF- $\alpha$  stimulierte DC sowie alle drei Ansätze mit Zugabe des TNF- $\alpha$  Antikörpers in der MLR eingesetzt und die Proliferation der T-Zellen nach 5 Tagen durch die Menge des eingebauten radioaktiv markierten  $^3\text{H}$  Thymidin gemessen. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind für IL-16 stimulierte DC in Abb.55 und für die TNF- $\alpha$  behandelten Zellen in Abb.56 dargestellt.

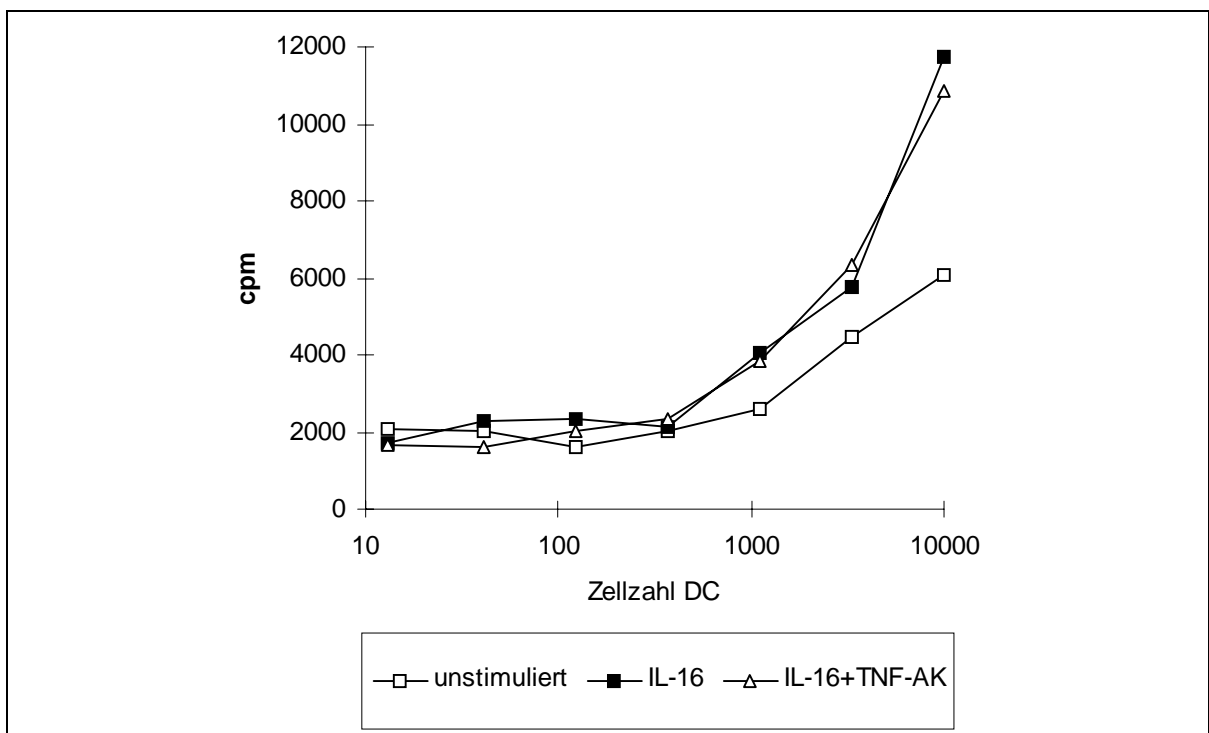


Abb.55: Einfluss eines TNF- $\alpha$  AK in Kombination mit IL-16 auf die MLR. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 Versuchen. Es wurden  $1 \times 10^5$  Lymphozyten/ml sowie DC in den Konzentrationen  $1 \times 10^4$ ,  $3,3 \times 10^3$ , 370, 123, 41, 13 Zellen/ml eingesetzt.

DC sind in der Lage T-Zellen zu stimulieren. Aktivierte DC, wie hier nach Stimulation mit IL-16 konnten T-Zellen stärker aktivieren als unreife unstimulierte DC. Die Fähigkeit der DC zur Aktivierung der T-Zellen wurde durch Zugabe eines TNF- $\alpha$ -AK in Kombination mit IL-16 im Vergleich zu den nur mit IL-16 stimulierten DC nicht verändert. Die Ausreifung und Fähigkeit zur T-Zellstimulation war also unabhängig von TNF- $\alpha$  und konnte von IL-16 allein vermittelt werden.

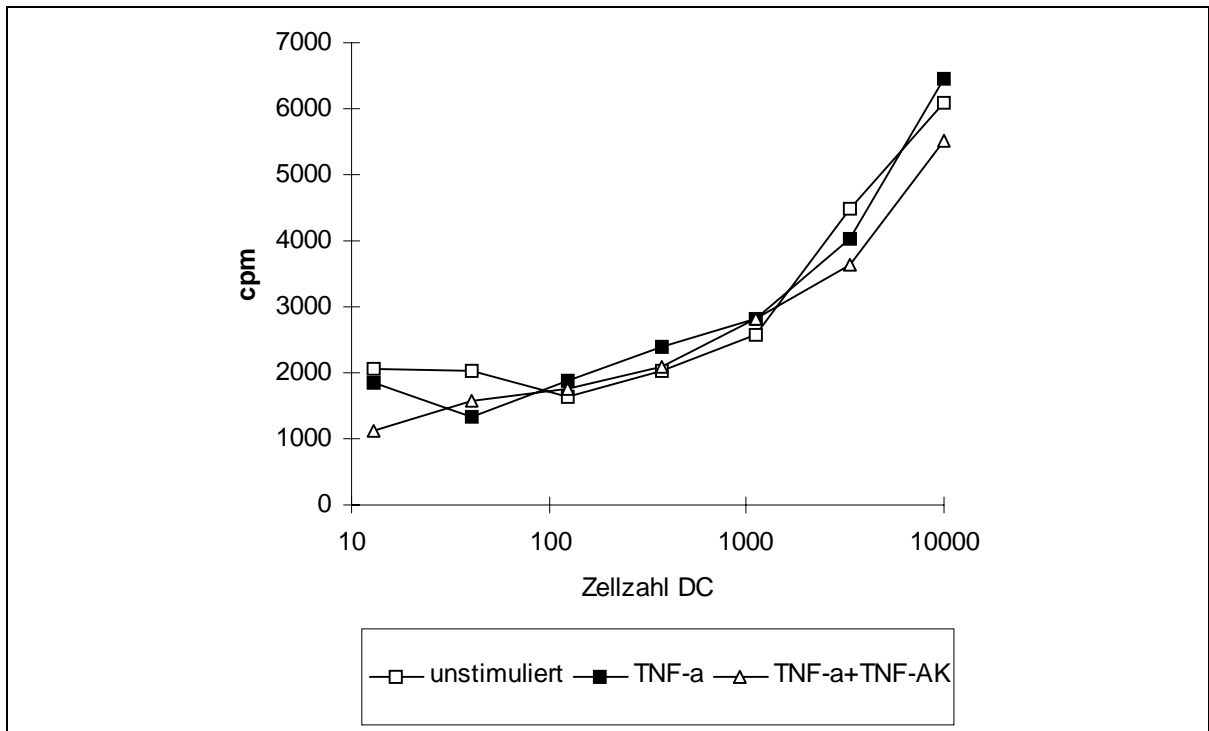


Abb.56: Einfluss eines TNF- $\alpha$ -AK in Kombination mit TNF- $\alpha$  auf die MLR. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 Versuchen. Es wurden  $1 \times 10^5$  Lymphozyten/ml sowie DC in den Konzentrationen  $1 \times 10^4$ ,  $3,3 \times 10^3$ , 370, 123, 41, 13 Zellen/ml eingesetzt.

Die Stimulation von 7 Tage alten DC mit TNF- $\alpha$  führte nicht zu einer besseren Aktivierung von T-Zellen. Der Einbau von radioaktiv markierten  $^3\text{H}$  Thymidin war genauso groß wie bei unbehandelten DC. Die Zugabe eines TNF- $\alpha$  AK in Kombination mit TNF- $\alpha$  führte zu keiner Veränderung in der T-Zellaktivierung durch diese DC im Vergleich zu TNF- $\alpha$  stimulierten DC.

## 4 Diskussion

Monozyten bzw. Makrophagen und dendritische Zellen sind wichtige Komponenten des Immunsystems. Sie regulieren und initiieren die Immunantwort durch die Präsentation von Antigenen, die Sekretion von Zytokinen und durch kostimulierende Signale für die T-Zell Aktivierung (Doherty, 1995; Hart, 1997). Die im Verlauf dieser Arbeit durchgeführten Experimente sollten die Wirkung des Zytokins IL-16 auf Monozyten und unreife DC zeigen. IL-16 ist ein chemotaktisch wirkendes Zytokin, welches seine biologische Wirkung über den CD4 Rezeptor der Zellen vermittelt. Für diese Experimente wurde von *E. coli* Bakterien produziertes rekombinantes IL-16 benutzt. Das Zytokin musste in einer relativ hohen Konzentration (1µg/ml) eingesetzt werden, da das Protein nur zu einem kleinen Teil als biologisch aktives Tetramer vorlag. In dieser Arbeit wurden die Zellen nach Kultivierung mit IL-16 auf Veränderungen hinsichtlich ihres Aktivitätsstatus untersucht. Es wurde die Expression von Oberflächenmolekülen, die Induktion und Sekretion verschiedener Zytokine und Chemokine sowie die chemotaktische Wirkung von IL-16 auf DC und Monozyten untersucht. Zusätzlich sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob unreife DC nach Kultivierung mit IL-16 ausreifen, was durch Analyse DC spezifischer Oberflächenantigene sowie den Einsatz dieser DC in der MLR gezeigt werden sollte.

### 4.1 Zellisolierung

Für die Versuche war es nötig, möglichst reine Monozyten zu gewinnen. Ziel bei der Aufarbeitung des Buffy-Coats war es, alle anderen Zellen abzutrennen. Dabei war es sehr wichtig, möglichst die Lymphozyten zu entfernen, um eine Beeinflussung auf die Monozyten und die spätere Ausreifung zu DC zu minimieren.

Lymphozyten können einen störenden Einfluss z.B. durch die Produktion von IL-2 oder Interferon- $\gamma$  ausüben. Beide Zytokine werden von T-Helfer-Zellen gebildet und können zusätzlich zu den in den Versuchen eingesetzten Stimuli aktivierend auf die Monozyten wirken und so die Ergebnisse verfälschen. Im Chemotaxis-Versuch würden die Lymphozyten schneller durch die Membran wandern, da sie kleiner als Monozyten und DC sind und somit einfacher durch die Poren der Membran gelangen könnten.

Als Aufarbeitungsmethode wurde die Aufreinigung über Ficoll-Paque und anschließende Elutriation gewählt. Diese Methode erlaubte es, zu ca. 90% reine Monozyten mit einer geringen Menge kontaminierender Lymphozyten (5-8%) zu gewinnen. Die geringe Menge an Lymphozyten dürfte nur minimalen störenden Einfluss haben oder zumindest in allen Versuchen die gleichen Auswirkungen haben.

Eine Aufreinigung über Adhärenz an Plastikschaalen wurde nicht gewählt, da diese Methode durch den Zellverlust bei den einzelnen Waschschritten nicht die hohe Zellzahl und Reinheit der Monozyten liefern konnte wie die Elutriation. Außerdem bestand die

Gefahr der Zellschädigung beim Ablösen der Monozyten vom Schalenboden und es wurde beschrieben, dass Adhärenzaufreinigung über Plastikschaalen zur Aktivierung von Monozyten führen kann (Bennett et al., 1994, Haskill et al., 1988).

## 4.2 Einfluss von IL-16 auf Monozyten

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte der Einfluss von IL-16 auf Monozyten gezeigt werden. Dies wurde zum einen durch die Analyse des Oberflächenantigens CD25 herausgefunden. CD25 ist ein Aktivierungsmarker für Monozyten. Es handelt sich hierbei um den IL-2R $\alpha$ , der im Gegensatz zu IL-2R $\beta$  nicht konstitutiv auf Monozyten exprimiert wird (Valitutti et al. 1989; Branch et al., 1993), sondern erst nach Aktivierung der Zellen durch verschiedene Stimuli wie z.B. LPS (Kniep et al., 1992) auf der Zellmembran nachgewiesen werden kann. Nach Stimulation der Monozyten mit IL-16 für 18h war eine deutliche Expression von CD25 auf der Zellmembran nachweisbar, während dies bei unbehandelten Monozyten nicht der Fall war. Bei Lymphozyten konnten Cruikshank et al. ebenfalls eine Erhöhung der CD25 Expression nach 24 stündiger Inkubation mit IL-16 zeigen. (Cruikshank et al., 1987; Cruikshank et al., 1994; Theodore et al., 1995).

Vor diesen Versuchen war nur bekannt, dass für die Aktivierung und damit verbundene Zunahme der CD25 Expression (IL-2R $\alpha$ ) bei Lymphozyten zwei Signale benötigt werden. Das erste Signal muss durch Bindung des an MHC gebundenen Antigens an den T-Zell-Antigenrezeptor (TCR) vermittelt werden. Dabei kommt es zu einer Zusammenlagerung von TCR, CD3 und CD4 auf der Lymphozytenmembran. Erst das zweite Signal, welches durch verschiedene Wachstumsfaktoren wie IL-2 übermittelt wird, führt zur Aktivierung der Zelle (Smith et al., 1979). IL-16 ist nun in der Lage, das erste Signal über den CD4 Rezeptor der Zelle zu vermitteln und benötigt somit das Signal über den TCR nicht. Die Erhöhung der CD25 Expression nach Inkubation der Monozyten mit IL-16 lässt vermuten, dass wie bei den Lymphozyten ein Aktivierungssignal direkt über den CD4 Rezeptor der Monozyten vermittelt werden kann, zumal Monozyten auch keinen TCR exprimieren. Neuste Studien lassen jedoch vermuten, dass es neben CD4 einen noch unbekanntem Korezeptor für IL-16 geben muss, da in Versuchen mit PBML von CD4 Knock-out Mäusen eine Stimulation dieser Zellen durch IL-16 zu beobachten war (Mathy et al., 2000a).

In weiteren Untersuchungen sollte geklärt werden, ob neben der Veränderung des Oberflächenantigens CD25 auch funktionelle Fähigkeiten von Monozyten nach Inkubation mit IL-16 verändert waren. Ein weiteres Aktivierungsmerkmal von Monozyten ist die Induktion und Sekretion verschiedener Zytokine und Chemokine. Monozyten können eine ganze Reihe von Zytokinen produzieren wie z.B. IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, TNF- $\alpha$  und Kolonie stimulierende Faktoren, wobei IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$

proinflammatorische Zytokine sind während IL-10 antiinflammatorisch wirkt. In dieser Arbeit wurde die Wirkung von IL-16 auf die Induktion und Sekretion der Zytokine und Chemokine IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  und MCP-1 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass unbehandelte Monozyten diese Proteine nicht produzieren und mRNA nur in einer kaum nachweisbaren Menge gefunden wurde. Nach Stimulation der Zellen mit IL-16 wurden alle Gene, bis auf IL-12 induziert und es konnte somit eine erhöhte Menge an mRNA im RPA im Vergleich zu den unbehandelten Monozyten nachgewiesen werden. Daneben konnten diese Zytokine und Chemokine in hohen Konzentrationen in den Überständen der Zellen detektiert werden. Jedoch konnte auch auf Proteinebene kein IL-12 nachgewiesen werden. IL-12 induziert eine Th1 Antwort und inhibiert die Th2 Antwort (Trinchieri et al., 1996). Aus der Literatur ist bekannt, dass IL-16 bei allergischen Reaktionen, wie z.B. dem allergischen Asthma eine große Rolle spielt. Diese allergischen Reaktionen basieren auf einer Th2 Antwort, so dass IL-16 verhindert, dass das Th2 inhibierende Zytokin IL-12 gebildet wurde. Daneben wurden aber Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  nach Stimulation mit IL-16 produziert, die eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen spielen. Die Stimulation von Th2-Zellen durch das von den Monozyten produzierte IL-1 kann in der Folge zu einer Erhöhung des IL-4 Titers, welches ein typisches Th2 Zytokin ist, führen. IL-4 induziert die Proliferation von T- und B-Zellen und kann zu einer polyklonalen B-Zell-Aktivierung und damit zu einer erhöhten Produktion von Immunglobulinen, insbesondere IgG1 und das bei allergischen Reaktionen wichtigen IgE führen (Mosmann et al., 1986). Aktivierte Th2-Zellen werden durch IL-1 zur Produktion von IL-4 und IL-5 angeregt und geben damit ein auslösendes Signal für die Proliferation und Ausreifung der B-Zellen zur antikörpersezernierenden Plasmazelle. Neben diesen Zytokinen produzierten durch IL-16 aktivierte Monozyten zusätzlich verschiedene Chemokine. Diese Chemokine locken andere Zellen wie z.B. Lymphozyten, Granulozyten und Makrophagen zum Ort der Entzündung oder führen zum Einstrom von Zellen bei allergischen Reaktionen.

Eine weitere Wirkung von IL-16 ist die Inhibition der HIV Replikation (Baier et al., 1995). Diese könnte durch die Produktion von Zytokinen gesteuert werden. Die von IL-16 stimulierten Monozyten produzierten Chemokine MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  und RANTES sind bekannt als Suppressor der HIV Replikation (Cocchi et al., 1995). Dies deutet daraufhin, dass IL-16 indirekt über die Induktion dieser Chemokine in Monozyten die HIV Replikation hemmen kann. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Mathy et al., die nach Stimulation von Monozyten mit IL-16 weder MIP-1 $\alpha$  noch RANTES in den Überständen der Zellen detektieren konnten (Mathy et al., 2000b).

Dies in dieser Arbeit verwendete rekombinante IL-16 wirkte chemotaktisch auf Monozyten. Die chemotaktische Aktivität war jedoch nur bei Monozyten nachweisbar, die zuvor adhärirt und 24 Stunden in Kultur gehalten wurden. Frisch isolierte Monozyten

wurden von IL-16 nicht angezogen. Dies könnte an der Voraktivierung der Monozyten durch Plastikadhärenz liegen. Es scheint, dass nur voraktivierte Monozyten chemotaktisch auf IL-16 reagieren können. Die Arbeitsgruppe Cruikshank et al. (1987) konnte eine chemotaktische Wirkung von natürlichem IL-16 auf humane Monozyten nachweisen, nachdem die Monozyten über Plastikadhärenz gereinigt worden waren.

Eine andere Erklärung dafür, dass frische Monozyten nicht chemotaktisch auf IL-16 reagierten, wäre der Stress oder die zu geringe Temperatur von 10°C während der Elutriation. Die Monozyten waren vielleicht nicht in der Lage, nach dieser Behandlung chemotaktisch zu reagieren. Dagegen sprechen jedoch die Ergebnisse für die Positivkontrolle FMLP. FMLP war in der Lage, frische Monozyten anzulocken, während dies bei 24h alten Monozyten nicht nachweisbar war.

### 4.3 Einfluss von IL-16 auf dendritische Zellen

Um den Einfluss von IL-16 auf unreife DC zu untersuchen wurden isolierte humane Blutmonozyten für 7 Tage mit GM-CSF und IL-4 *in vitro* kultiviert. Dies ist eine etablierte Methode zur Generierung von DC aus Monozyten (Romani et al., 1996). Eine weitere Möglichkeit zur Generierung von DC *in vitro* ist die Kultivierung von CD34<sup>+</sup> Knochenmarkstammzellen mit GM-CSF (Inaba et al., 1992). Für diese Arbeit wurde die Generierung von DC aus Blutmonozyten gewählt, da die monozytenhaltige Leukozytenfraktion bei Blutspenden abgetrennt wurde und so für wissenschaftliche Untersuchungen ausreichend zur Verfügung stand, während humane Stammzellen nicht verfügbar waren.

Um den bestmöglichen Zeitpunkt zur Stimulation der DC mit IL-16 zu bestimmen, wurden DC an Tag 1, 3, 5 und 7 der Kultur mit IL-16 stimuliert und im Vergleich zu den unbehandelten DC auf die Expression DC spezifischer Oberflächenantigene untersucht. Es wurde die Expression von CD1a und CD83 analysiert, sowie die Größe und Granularität der Zellen bestimmt. CD1a Moleküle präsentieren Peptide und mikrobielle lipidhaltige Antigene den T-Zellen (Maher et al., 1997; Porcelli et al. 1992) und sind ein typischer Marker für DC unabhängig vom Reifungsgrad der Zellen. CD83 ist ein Reifungsmarker für DC. CD83 ist auf unreifen DC nicht vorhanden, während dieses Oberflächenantigen auf reifen DC stark exprimiert wird (Zhou et al., 1992; Zhou et al. 1995b). Die Zellen nahmen über die Kulturzeit von 7 Tagen stetig an Größe und Granularität zu, was sich durch Kultivierung mit IL-16 an den einzelnen Untersuchungstagen noch steigern ließ. An Tag 7 zeigten die Zellen die für DC typische Verteilung im Dot Blot. Das DC typische Oberflächenantigen CD1a konnte erstmals an Tag 3 detektiert werden, die Expression war jedoch sehr schwach und verstärkte sich aber stetig bis Tag 7. Die Kultivierung der DC mit IL-16 hatte keinen Einfluss auf die CD1a Expression. CD83 konnte zu keinem Zeitpunkt auf unbehandelten DC nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass es sich bei den hier



generierten Zellen um unreife DC handelte. Erst nach Stimulation mit IL-16 konnte CD83 auf der Zellmembran detektiert werden. Die stärkste CD83 Expression wurde an Tag 7 gemessen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die DC für alle weiteren Versuche an Tag 7 mit IL-16 stimuliert.

Um die Ausreifung der DC durch Zugabe von IL-16 an Tag 7 der Kultur zu zeigen, wurde die Expression weiterer Oberflächenantigene auf den DC untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von CD25, CD40, CD54, CD83, CD86 und HLA-DR im Vergleich zu unbehandelten DC deutlich erhöht war. Dies korreliert mit Daten aus der Literatur. Auch hier konnte eine Erhöhung der CD40 (McLellan et al., 1996), CD54 (Starling et al., 1995) und MHC-II Expression (Fearnley et al., 1997) bei reifen bzw. aktivierten DC gezeigt werden. Der Monozytenmarker CD14 war auf den 7 Tage alten unbehandelten DC nachweisbar, während nach Kultivierung mit IL-16 diese CD14 Expression deutlich geringer war. Auch andere Gruppen konnten auf unreifen mit GM-CSF und IL-4 kultivierten DC die Expression des Monozytenmarkers CD14 nachweisen (Kiertscher et al., 1996; Gieseler et al., 1998). Neben CD14 konnte auch die Expression des IL-16 Rezeptors CD125 durch Zugabe von IL-16 zum Kulturmedium stark reduziert werden.

Neben der phänotypischen Charakterisierung der DC wurde die Induktion und Sekretion verschiedener Zytokine und Chemokine der DC nach Stimulation mit IL-16 gemessen. Reife aktivierte DC können eine ganze Reihe verschiedener Zytokine sekretieren. Die Induktion der Gene IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, RANTES und MCP-1 wurde mittels RPA nachgewiesen und die sekretierten Proteine in den Überständen nachgewiesen. Zusätzlich konnte neben diesen Zytokinen auch TNF- $\alpha$  in den Überständen der Zellen detektiert werden. TNF- $\alpha$  wird häufig zur Ausreifung von DC *in vitro* eingesetzt und führt zur Differenzierung von DC zu DC1-Zellen, die naive T-Zellen aktivieren und zu IFN- $\gamma$  sekretierenden Th1-Zellen ausreifen lassen (Heufler et al., 1996). Ein wichtiges Merkmal von DC1-Zellen ist die Produktion von IL-12. Nach Stimulation von unreifen DC mit IL-16 konnte jedoch kein IL-12 in den Überständen der DC nachgewiesen werden, dafür wurde jedoch eine hohe Konzentration von IL-10 detektiert. Dies sind die typischen Merkmale für DC2-Zellen. IL-10 hemmt die Entwicklung von DC zu DC1-Zellen und die Wirkung von IL-10 auf die DC kann zu einer Toleranz-Induktion bei T-Zellen durch diese DC2-Zellen führen (Steinbrinck et al., 1997). DC2-Zellen können naive T-Zellen aktivieren und zur Produktion von Th2-Zytokinen wie IL-4 und IL-5 anregen. Zur Generierung von DC2-Zellen kann auch Prostaglandin E<sub>2</sub> verwendet werden (Kalinski et al., 1997). *In vitro* generierte DC sollen bei bestimmten Krankheiten eingesetzt werden. DC1-Zellen sollen mit Tumorantigenen beladen werden und so naive T-Zellen zu einer Antwort gegen den Tumor anregen. DC2-Zellen dagegen sollen bei der Therapie von Allergien und Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden. Es ist also wichtig, verschiedene Stimulanzen für DC zu finden, die es ermöglichen, die Ausreifung von DC

zu DC1- oder DC2-Zellen zu steuern. Neuste Studien zeigen, dass für eine systemische Anti-Tumortherapie der alleinige Einsatz von DC1 nicht ausreicht. Es wird ein ausgeglichenes Verhältnis von Th1- und Th2-Zytokinen benötigt. Die von den Th2-Zellen produzierten Zytokine IL-4 und IL-5 können andere Zellen wie Makrophagen (angelockt durch IL-4) und Eosinophile (angelockt durch IL-5) zum Tumor locken, wo diese helfen, den Tumor zu bekämpfen (Hung et al., 1998). Außerdem kann IL-4 direkt das Tumorwachstum hemmen (Obiri et al., 1993).

Neben der Generierung von DC mit IL-16 *in vitro* für den Einsatz in verschiedenen Therapien ist auch die Wirkung von IL-16 auf im Körper vorhandene DC zu klären. Bei allergischen Reaktionen kann das gebildete IL-16 DC stimulieren und somit zu einer Verstärkung der allergischen Reaktion durch die weitere Aktivierung von Th2-Zellen führen. Studien zeigen, dass bei Patienten mit allergischem Asthma die Anzahl der DC in den Luftwegen deutlich erhöht ist im Vergleich zu Kontrollpersonen (Semper et al. 1996). Allergene können so in größerer Menge den T-Zellen präsentiert werden und durch die verstärkte Produktion von Chemokinen und Zytokinen werden weitere Zellen angelockt und aktiviert. Durch IL-8 werden neutrophile Granulozyten und T-Zellen angelockt. RANTES führt zu einem Einstrom von Monozyten und T-Zellen und den bei allergischen Reaktionen wichtigen Eosinophilen. Das von den DC produzierte IL-1 führt zu einer Aktivierung der T-Zellen und Makrophagen.

Ein weiteres wichtiges Merkmal für die Reifung und Aktivität der DC ist die Fähigkeit dieser Zellen allogene T-Zellen zu stimulieren (Steinman et al. 1974). DC sind die effektivsten T-Zell stimulierenden Zellen im Vergleich zu anderen antigenpräsentierenden Zellen wie z.B. Monozyten und B-Zellen (Thomas et al. 1993). Die in dieser Arbeit eingesetzten mit IL-16 stimulierten DC konnten allogene T-Zellen besser stimulieren als die unbehandelten DC. Der Einbau von radioaktiv markierten <sup>3</sup>H Thymidin durch die T-Zellen war bei Kokultur mit IL-16 stimulierten DC ca. doppelt so hoch wie bei der Kokultur mit unbehandelten unreifen DC.

Aus Monozyten generierte unreife DC können durch Zugabe von TNF- $\alpha$  ausreifen (Lardon et al. 1997). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass DC nach Stimulation mit IL-16 TNF- $\alpha$  produzieren. Durch Zugabe eines TNF- $\alpha$  AK konnte die biologische Aktivität des TNF- $\alpha$  inhibiert werden und das Zytokin konnte die Ausreifung der DC nicht mehr beeinflussen. Dies konnte durch Analyse der Oberflächenantigene, der Zytokinproduktion und der Fähigkeit der DC T-Zellen in der MLR zu stimulieren, gezeigt werden. Sowohl mit IL-16 wie mit TNF- $\alpha$  stimulierte DC exprimierten mehr CD40, CD83 und CD86 im Vergleich zu unstimulierten DC. Nach Zugabe des TNF- $\alpha$  neutralisierenden AK gleichzeitig mit IL-16 bzw. TNF- $\alpha$  zu den unreifen DC konnte nur noch bei den IL-16 stimulierten DC eine Zunahme der Expression dieser Oberflächenantigene gezeigt werden. TNF- $\alpha$  stimulierte DC unterschieden sich bei Zugabe des AK nicht von den unbehandelten DC. Diese Ergebnisse konnten durch Analyse der Zytokinproduktion bestätigt werden. In

den Überständen von IL-16 wie auch TNF- $\alpha$  stimulierten Zellen konnte TNF- $\alpha$  wie auch IL-10 detektiert werden. Nach Zugabe des AK konnte wie zu erwarten war, in beiden Ansätzen kein TNF- $\alpha$  mehr nachgewiesen werden, so dass die Wirkungen von IL-16 auf die Ausreifung der DC unabhängig von TNF- $\alpha$  sein musste. Daneben wurde die Produktion von IL-10 bestimmt. IL-16 wie auch TNF- $\alpha$  stimulierte DC produzierten IL-10. Nach Zugabe des TNF- $\alpha$  AK konnte bei den TNF- $\alpha$  stimulierten DC, wie bei den unbehandelten DC, nur sehr wenig TNF- $\alpha$  nachgewiesen werden, während die IL-10 Produktion bei den IL-16+TNF- $\alpha$  AK behandelten Zellen sich kaum von der nur mit IL-16 behandelten DC unterschied.

Die biologische Aktivität der DC war je nach Stimulus jedoch verschieden. Im Unterschied zu IL-16 stimulierten DC, konnten DC nach Zusatz von TNF- $\alpha$  T-Zellen in der MLR nicht besser stimulieren als unbehandelte DC. Eine Erklärung wäre, dass das eingesetzte TNF- $\alpha$  biologisch nicht aktiv war. Dagegen sprechen jedoch die Ergebnisse der Rezeptoranalyse und die Zytokinproduktion der TNF- $\alpha$  stimulierten DC. Hier konnte phänotypisch und funktionell eine Ausreifung der DC durch TNF- $\alpha$  gezeigt werden.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von IL-16 auf humane Monozyten und DC *in vitro* untersucht. Hierzu wurden zunächst humane Monozyten, die mittels Elutriation aus PBMC gewonnen wurden mit IL-16 stimuliert und auf phänotypische und funktionelle Veränderungen im Vergleich zu unbehandelten Monozyten untersucht. Das Oberflächenantigen und gleichzeitiger Aktivierungsmarker CD25 war nach Stimulation der Monozyten viel stärker exprimiert als bei den unbehandelten Zellen. Zusätzlich konnte eine Induktion und Sekretion der Zytokine und Chemokine IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1 und RANTES durch die Stimulation mit IL-16 gezeigt werden. IL-12 konnte nicht detektiert werden. Neben der Veränderung der Zellfunktion konnte die chemotaktische Wirkung von IL-16 auf Monozyten gezeigt werden. Frisch isolierte Monozyten wurden nicht von IL-16 angezogen. Erst nach Kultivierung der Zellen für 24h konnte eine chemotaktische Wirkung von IL-16 auf die Monozyten nachgewiesen werden. Zusätzlich zur Erforschung der Wirkung von IL-16 auf Monozyten, wurde der Effekt von IL-16 auf humane DC *in vitro* untersucht. Unreife DC wurden aus Monozyten durch Zugabe von GM-CSF und IL-4 generiert. Der bestmögliche Zeitpunkt für eine Stimulation der Zellen war Tag 7 der Kultur. An diesem Tag war die Expression des DC typischen Oberflächenantigens CD1a am höchsten und die Zellen hatten eine maximale Größe erreicht. Die mit IL-16 stimulierten DC exprimierten mehr CD25, CD40, CD54, CD83, CD86 und HLA-DR auf der Zellmembran während die Expression von CD4 und CD14 im Vergleich zu unbehandelten DC verringert war. Dies zeigte deutlich, dass DC durch Stimulation mit IL-16 ausreifen können. Zusätzlich wurden die Zellen auf die Induktion und Sekretion verschiedener Zytokine und Chemokine untersucht. Es konnten IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , MCP-1 und RANTES nachgewiesen werden. IL-12 konnte auch hier wie bei den Monozyten nicht detektiert werden. Die DC ließen sich aufgrund dieses charakteristischen Zytokinmusters zu den DC2-Zellen einordnen. Daneben sind die IL-16 stimulierten DC besser in der Lage, T-Zellen in der MLR zu aktivieren im Vergleich zu den unreifen unbehandelten DC. Die Wirkungen von IL-16 auf unreife DC sind unabhängig von TNF- $\alpha$ . Dies konnte durch Zugabe eines TNF- $\alpha$  Antikörpers gleichzeitig zur Stimulation mit IL-16 gezeigt werden. Der Antikörper konnte die Ausreifung und damit verbundene Zunahme der Expression von Oberflächenantigenen wie CD40 und CD83, sowie die Sekretion von IL-10 nicht verändern. Auch die Fähigkeit der DC, T-Zellen in der MLR zu stimulieren, wurde nicht verändert.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass IL-16 eine Wirkung auf die humanen antigenpräsentierenden Zellen wie Monozyten und DC hat. Diese Zellen können durch IL-16 stimuliert und zu einer Produktion von Th2-Zellen aktivierenden Zytokinen angeregt werden. Diese Ergebnisse können helfen, die Rolle von IL-16 bei allergischen Reaktionen besser zu verstehen und IL-16 als einen möglichen Zusatz bei der Kultivierung und Generierung von DC *in vitro* zu therapeutischen Zwecken zu charakterisieren.

## 6 Literaturverzeichnis

Adams, D.O. (1989)

Molecular interactions in macrophage activation

*Immunol. Today*, 10: 33-35

Aschoff, L. (1924)

Das reticulo-endotheliale System

*Ergebn. in med. Kinderheilkunde*, 26: 1-118

Babior, B.M., (1984)

The respiratory burst oxidase

*Trends in Biochemical Science*, 12: 241-243

Bagby, G.C.Jr., Dinarello, C.A., Wallace, P., Wagner, C., Hefeneider, S. und McCall, E. (1986)

Interleukin-1 stimulates granulocyte macrophage colony-stimulating activity release by vascular endothelial cells

*J. Clin. Invest.*, 78: 1316-1323

Baier, M., Werner, A., Bannert, N., Metzner, K. und Kurth, R. (1995)

HIV suppression by interleukin-16

*Nature*, 378: 563

Banchereau, J. und Steinman, R.M. (1998)

Dendritic cells and the control of immunity

*Nature*, 392: 245-252

Bennet, S. und Breit, S.N. (1994)

Variables in the isolation and culture of human monocytes that are of particular relevance to studies of HIV

*J.Leuc.Biol.*, 56: 236-240

Berman, J.S., Cruikshank, W.W., Center, D.M., Theodore, A.C. und Beer, D.J. (1985)

Chemoattractant lymphokines specific for the helper/inducer T-lymphocyte subset

*Cell.Immunol.*, 95: 105-112

Bhardwaj, N., Bender, A., Gonzalez, N., Bui, L.K., Garrett, M.C. und Steinman, R.M. (1994)

Influenza virus-infected dendritic cells stimulate strong proliferative and cytolytic responses from human CD8<sup>+</sup> T cells

*J. Clin. Invest.*, 94: 797-807

Brach, M.A., Arnold, C., Kiehntopf, M., Gruss, H.-J. und Herrmann, F. (1993)

Transcriptional activation of the macrophage colony-stimulating factor gene by IL-2 is associated with secretion of bioactive macrophage colony-stimulating factor protein by monocytes and involves activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B.

*J.Immunol.*,150: 5535-5543

Broudy, V.C., Kaushansky, K., Segal, G.M., Harlan, J.M. und Adamson, J.W. (1986)

Tumor necrosis factor type alpha stimulates human endothelial cells to produce granulocyte / macrophage colony stimulating factor

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 7467-7471

Cannistra, S.A., Rambaldi, A., Spriggs, D.R., Herrmann, F., Kufe, D. und Griffin, J.D. (1987)

Human granulocyte-macrophage colony stimulating factor induces expression of the tumor necrosis factor gene by U937 cell line and by normal peripheral blood monocytes

*J.Clin.Invest.*, 79: 1720-1728

Caleda, A. und Nathan, C. (1994)

Macrophage activation revisited

*Immunol. Today*, 15: 100-102

Caux, D., Vanbervliet, B., Masscrier, C., Azuma; M., Okukura, K., Lanier, L.L. und Banchereau, J. (1994)

B70/b7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells

*J.Exp.Med.*, 180: 1841-1847

Caux, C., Masscrier, C., Dezutter-Dambuyant, C., de Saint-Vis, B., Schmitt, D. und Banchererau, J. (1996)

CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF- $\alpha$

*J. Exp. Med.*, 184: 695-706

Buelens, C., Verhasselt, V., De Groote, D., Thielemans, K., Goldman, M. und Willems, F. (1997)

Human dendritic cells responses to lipopolysaccharide and CD40 ligation are differentially regulated by IL-10

*Eur. J. Immunol.*, 27: 1848-1852

Center, D.M. und Cruikshank, W. (1983)

Functional characteristics of histamine receptor-bearing mononuclear cells.

1. Selective production of lymphocyte chemoattractant lymphokines with histamine used as a ligand

*J.Immunol.*, 131: 1854-1859

Center, D.M. und Cruikshank, W.W. (1982)

Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. I. Identification and characterization of chemoattractant activity for lymphocytes from mitogen-stimulated mononuclear cells

*J.Immunol.*, 128: 2563-2568

Cocchi, F., De Vico, A.L., Garzino-Demo, A., Arya, S.K., Gallo, R.C. und Lusso, P. (1995)

Identification of RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells

*Science*, 270: 1811-1815

Cruikshank, W.W. und Center, D.M. (1982)

Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. II. Purification of a lymphotactic factor (LCF)

*J.Immunol.*, 128: 2569-2571

Cruikshank, W.W., Berman, J.S., Theodore, A.C., Bernado, J. und Center, D.M. (1987)

Lymphokine activation of a T4<sup>+</sup> T lymphocytes and monocytes

*J.Immunol.*, 138: 3817-3823

Cruikshank, W.W., Greenstein, J.L., Theodore, A.C. und Center, D.M. (1991)

Lymphocyte chemoattractant factor induces CD4-dependent intracytoplasmic signaling in lymphocytes

*J.Immunol.*, 146: 2928-2934

Cruikshank, W.W., Center, D.M., Nisar, N., Wu, M., Natke, B., Theodore, A.C. und Kornfeld, H. (1994)

Molecular and functional analysis of a lymphocyte chemoattractant factor: Association of biologic function with CD4 expression

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 5109-5113

Doherty, TM (1995)

T-cell regulation of macrophage function

*Curr. Opin. Immunol.*, 7: 400-404

Espinoza-Delgado, I., Longo, D.L., Gusella, G.L. und Varesio, L. (1990a)

IL-2 enhances c-fms expression in human monocytes

*J. Immunol.*, 134: 1137-1143

Fayette, J., Dubois, B., Vandenabeele, S., Bridon, J.M., Vambervliet, B., Durand, I., Banchereau, J., Caux, C. und Bierre, F. (1997)

Human dendritic cells skew isotype switching of CD40-activated B-lymphocytes

*J. Exp. Med.*, 185: 1909-1918

Ferreri, M., Millet, I., Paliwal, V., Herzog, W., Solomon, D., Ramabhadran, R. und Askenase, P.W. (1991)

TNF alpha is an effective therapeutic target for rheumatoid arthritis

*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 766: 272-278

Frelinger, J.G., Hood, L., Hill, S., Frelinger, J.A. (1979) ?

Mouse epidermal molecules have a bone marrow origin

*Nature*, 282: 321-323

Furth, R van, Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphry, J.H., Spector, W.G., und Langevoort, H.L. (1972)

The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes and their precursor cells.

*Bull, WHO*, 46: 845-852

Garman, R.D., Jacobs, K.A., Clark, S.C. und Raulet, D.H. (1987)

B-cell stimulatory factor 2 (B2 Interferon) functions as a second signal for Interleukin 2 production by mature T cells

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 7629-7633



Gaudernalk, G. und Bjercke, S. (1985)

Dendritic cells and monocytes as accessory cells in T-cell responses in man. I. Phenotypic analysis of dendritic cells and monocytes

*Scand. J. Immunol.*, 21: 493-500

Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorff, P. und Baumann, F. (1987)

Interferon B2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase response in liver cells

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 7251-7255

Gieseler, R., Heise, D., Soruri, A., Schwatz, P. und Peters, J.H (1998)

*In-vitro* differentiation of mature dendritic cells from human blood monocytes

*Develop. Immunol.*, 6: 25-39

Goordyal, P. und Isaacson, P.G. (1985)

Immunocytochemical characterisation of monocyte colonies of human bone marrow: A clue to the origin of Langerhans cells and interdigitating reticulum cells

*J. Pathol.*, 146: 189-195

Goud, T.J.L.M. und van Furth, R. (1975)

Identification and characterization of the monoblast in mononuclear phagocytes colonies growth in vitro

*J. Exp. Med.*, 142: 1180-1199

Grabske, R.J. (1978)

Separating cell populations by elutriation

*Fractions*, 1: 1-8

Hart, D.N.J. (1997)

Dendritic cells: Unique leukocyte population which control the primary immune response

*Blood*, 90: 3245-3287

Haskill, S., Johnson, C., Eiermann, D., Becker, S. und Warren, K. (1988)

Adherence induces selective mRNA expression of monocyte mediators and proto-oncogenes

*J.Immunol.*, 140: 1690-1694

Heufler, C., Koch, F., Stanz, U., Topar, G., Wysocka, M., Trinchieri, G., Enk, A. und Steinman, R.M. (1996)

Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells

*Eur. J. Immunol.*, 26: 659-668

Ibelgaufts, H. (1992)

Lexikon Zytokine

*Medikon Verlag München*

Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S. und Steinmann, R.M. (1992)

Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor

*J. Exp. Med.*, 176: 1693-1702

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

*Exp. Med.*, 178: 479-488

Inaba, K., Pack, M., Inaba, M., Sakuta, H., Isdell, F. und Steinman, R.M. (1997)

High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from lymph node

*J. Exp. Med.*, 186: 665-672

Janeway, C.A., und Travers, P.

Immunologie

*Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg*

Johnson, W.J., Steplewski, Z., Matthews, T.J., Hamilton, T.A., Koprowski, H. und Adams, D.O. (1986)

Cytolytic interactions between murine macrophages, tumor cells, and monoclonal antibodies: characterization of lytic conditions and requirements of effector activation

*J. Immunol.*, 136: 4704-4713

Jones, A.L. und Millar, J.L. (1989)

Growth factors in hemopoetopoiesis

*Clinical hematology: A plastic Aneamia* (ed. E.C. Gordon Smith).

Bailliere Tindall, London

Kalinski, P., Hilkens, C.M., Sniijders, A., Sniijewint, F.G. und Kapsenberg, M.L. (1997)

IL-12-deficient dendritic cellsw, generated in the presence of prostaglandine E2, promote type 2 production in maturing human naive T helper cells

*J. Immunol.*, 159: 28-35

Katz, S.I., Tamaki, K., Sachs, D.H. (1979)

Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow

*Nature*, 282: 324-326

Kniep, E.M. und Lohmann-Matthes, M.L. (1986)

Interleukin-2 activates human monocytes to cytotoxicity

*Immunbiol.*, 173: 122-126

Kniep, E.M., Strelow, I. und Lohmann-Matthes, M.L. (1992)

The monocyte interleukin-2 receptor light chain: production of cell-associated and soluble interleukin-2 receptor by monocytes

*J.Immunol.*, 75: 299-304

Krug, N., Cruikshank, W.W., Tschernig, T., Erpenbeck, V.J., Balke, K. Hohlfeld, J.M., Center, D.M., Fabel, H. (2000)

Interleukin-16 and T-cell chemoattractant activity in bronchoalveolar lavage 24 hours after antigen challenge in asthma

*Am. J. Res. Crit. Care. Med.*, 162 (1): 105-111

Kuby, J. (1992)

Immunologie, 1.Aufl., New York

Laberge, S., Cruikshank, W.W., Kornfeld, H. und Center, D.M. (1995)

Mechanism of histamine induced lymphocyte chemoattractant factor release from CD8<sup>+</sup> T cells

*J.Immunol.*, 155: 2902-2910

- Laberge, S., Cruikshank, W.W., Beer, D.J. und Center, D.M. (1996)  
Secretion of IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) from serotonin-stimulated CD8<sup>+</sup> T cells in vitro  
*J.Immunol.*, 156: 310-315
- Laemmli, U.K. (1970)  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophages T4  
*Nature*; 227: 680-685
- Lardon, F., Snoeck, H.W., Berneman, Z.N., Van Tendeloo, V.F., Nijs, G., Lenjou, M., Henckaerts, E., Boeckxtaens, C.J., Vandenabeele, P., Kerstens, L.L., Van Bockstaele, D.R. und Vanham, G.L. (1997)  
Generation of dendritic cells from bone marrow progenitors using GM-CSF, TNF-alpha and additional cytokines: antagonistic effects of IL-4 and IFN-gamma and selective involvement of TNF-alpha receptor-1  
*Immunology*, 91: 553-559
- Li, H., Schwinzer, R., Baccharini, M. und Lohmann-Matthes, M.-L. (1989)  
Cooperative effects of colony-stimulating factor 1 and recombinant interleukin-2 on proliferation and induction of cytotoxicity of macrophage precursors generated from mouse bone marrow cell cultures  
*J. Exp. Med.*, 169: 973-986
- Lindahl, P.E. (1948)  
Principles of a counter-streaming centrifuge for the separation of particles of different sizes  
*Nature*, 161: 648
- Lohmann-Matthes, M.L. (1981)  
Der Makrophage  
*Biologie in unserer Zeit*, 5: 135-143
- Maher, J.K. und Kronenberg; M. (1997)  
The role of CD1 molecules in immune responses to infection  
*Curr. Opin. Immunol.*, 9: 456-461
- Malkovsky, M., Loveland, B., North, M., Asherson, G.L., Gao, L., Ward, P. und Fiers, W., (1987)  
Recombinant interleukin-2 directly augments the cytotoxicity of human monocytes  
*Nature*, 325: 262-265

Mathy, N.L., Bannert, N., Norley, G. und Kurth, R. (2000 a)

Cutting edge: CD4 is not required for the functional activity of IL-16

*J. Immunol.*, 164 (9): 4429-4432

Mathy, N.L., Scheuer, W., Lanzendörfer, M., Honold, K., Ambrosius, D., Norley, S. und Kurth, R. (2000 b)

Interleukin-16 stimulates the expression and production of pro-inflammatory cytokines by human monocytes

*Immunology*, 100: 63-69

Matsumoto, M., Fu, Y.X., Molina, H., Huang, G., Kim, J., Thomas, D.A., Nahm, M.H. and Chaplin, D.D. (1997)

Distinct roles of lymphotoxin- $\alpha$  and type 1 TNF receptor in the establishment of follicular dendritic cells from non-bone marrow-derived cells

*J. Exp. Med.*, 186: 1997-2004

McEwen, C.R., Stallard, R.W. und Juhos, E.T. (1968)

Separation of biological particles by centrifugation elutriation

*Anal. Biochem.*, 23: 369-377

McLellan, A. D., Sorg, R.V., Williams, L.A., Hock, B. and Hart, D.N.J. (1996)

Human dendritic cells activate T-lymphocytes via a CD40:CD40 ligand-dependent pathway

*Eur. J. Immunol.*, 26: 1204-1210

Metcalf, D. (1971)

Transformation of granulocytes to macrophages in bone marrow colonies in vitro

*J. Cell. Physiol.*, 77: 277-280

Meuret, G., Bammert, J. und Hoffmann, G. (1974)

Kinetics of human monocytopoiesis

*Blood*, 44: 801

Mosmann, T.R., Cherwinsky, M.W., Mond, M., Geidlin, A. und Coffman, R.L. (1986)

Two types of murine helper T cell clones. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins

*J. Immunol.*, 136: 2348-2357

- Munker, R., Gasson, J., Ogawa, M. und Koeffler, H.P. (1986)  
Recombinant human tumor necrosis factor induces production of granulocyte-monocyte colony stimulating factor  
*Nature*, 323: 79-82
- Okada, M., Kitahara, M., Kishimoto, S., Matsuda, T., Hirano, T. und Kishimoto, T. (1988)  
IL-6/BSF-2 functions as killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells  
*J. Immunol.*, 141: 1543-1549
- Peveri, P., Waltz, A., Dewald, B. und Baggiolini, M. (1988)  
A novel neutrophil activating factor produced by human mononuclear phagocytes  
*J.Exp.Med.*, 167: 1547-1559
- Philip, R. (1988)  
Cytolysis of tumor necrosis factor (TNF)-resistant tumor targets. Differential cytotoxicity of monocytes activated by the interferons, IL-2 and TNF  
*J.Immun.*, 140: 1345-1349
- Porcelli; S., Morita, C.T. und Brenner, M.B. (1992)  
CD1b restricts the response of CD4-8-T lymphocytes to a microbial antigen  
*Nature*, 360: 593-597
- Reddy, A., Sapp, M., Subklewe, M. und Bhardwaj, N. (1997)  
A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytilines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells  
*Blood*, 90: 3640-3646
- Romani, N., Reider, D., Heuer, M., Ebner, S., Kampgen, E., Eibl., B., Niederwieser, D., und Schuler, G. (1996)  
Generation of mature dendritic cells from human blood: An improved method with special regard to clinical applicability  
*J. Immunol. Meth.*, 196: 137-151
- Sallusto, F. und Lanzavecchia, A. (1994)  
Efficient presentation of soluble antigen by cultered human dendritic cells is maintained by granulocyte/makrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor nekrose factor  $\alpha$   
*J. Exp. Med.*, 179: 1109-1118

- Sallusto, F. und Lanzavecchia, A. (1995)  
Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate antigen to MHC class II compartment. Downregulation by cytokines and bacterial products  
*J. Exp. Med.*, 182: 389-400
- Sanderson, R.J., Bird, K.E., Palmer, N.F. und Brenman, J. (1976)  
Design principles for a counterflow centrifugation cell separation chamber  
*Anal.Biochem.*, 71: 615-622
- Saunders, D., Lucas, K., Ismaili, J., Wu, L., Maraskovsky, E., Dunn, A. und Shortman, K. (1996)  
Dendritic cell development in culture from thymic precursor cells in the absence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor  
*J. Exp. Med.*, 184: 2185-2196
- Semper, A.E. und Hartley, J.A. (1996)  
Dendritic cells in the lung: what is their relevance to asthma?  
*Clin. Exp. Allergy*, 26: 485-490
- Sengupta, A., Liu, W.-K., Yeung, Y.G., Yeung, D.C.Y., Frackelton jr., A.R. und Stanley, E.R. (1988)  
Identification and subcellular localization of proteins that rapidly phosphotylated in tyrosine in response to colony-stimulating factor 1  
*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 85: 8062-8066
- Somers, S.D., Weirl, J.E. Hamilton, T.A. und Adams, D.O. (1986)  
Phorbol esters and calcium ionophore can prime murine peritoneal macrophages for tumor cell destruction  
*J.Immunol.*, 136: 4199-4205
- Starling; G.C., Egner, W., McLellan, A.D., Fawcett, J., Simms, D.L. und Hart, D.N.J. (1995)  
Intercellular adhesion molecule-3 is a costimulatory ligand for LFA-1 expressed on human blood dendritic cells  
*Eur.J.Immunol.*, 25: 2528-2532
- Steinbrinck, K., Wlfl, M., Jonuleit, H., Knop, J. und Enk, A.H. (1997)  
Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells  
*J. Immunol.*, 159: 4772-4780

- Steinmann, R.M. und Cohn, Z.A. (1973)  
Identifacation of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantification, tissue distribution  
*J. Exp. Med.*, 137: 1142-1167
- Steinmann, R.M.and Witmer, M.D. (1974)  
Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed lymphocyte reaction in mice  
*Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 75: 5132-5136
- Sallusto, F. und Lanzacecchia, 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 nekrose factor  $\alpha$   
*Exp. Med.*, 179: 1109-1118
- Sallusto, F. und Lanzacecchia, A. (1995)  
Dendritic cells use macropinocytosis and mannose receptor to concentrate antigen to the MHC class II compartment. Downregulation by cytokines and bacterial products  
*J. Exp. Med.*, 182: 389-400
- Strunk, D., Egger, C., Leitner, G., Hanau, D. und Singl, G.A. (1997)  
A skin homing molecule defines the Langerhans cells progenitor in human peripheral blood  
*J.Exp.Med.*, 185: 1131-1136
- Takatsuki, F., Okano, A., Suzuki, C., Chieda, R., Takahara, Y., Hirano, T., Kishimoto, T., Hamuro, J. und Akiyama; Y. (1988)  
Human recombinant IL-6/B cell stimulatory factor 2 augments murine antigen-specific antibody responses in vitro and in vivo  
*J. Immunol.*, 141: 3072-3077
- Theodore, A.C., Center, D.M., Nicoll, J., Fine, G., Kornfeld, H. und Cruikshank, W.W. (1996)  
CD4 ligand IL-16 inhibits the mixed lymphocyte reaction  
*J.Immonol.*, 157: 1958-1964
- Thomas, R., Davis, L.S. und Lipskey, P.E. (1993)  
Comparative accessory cell function of human blood dendritic cells and monocytes  
*J. Immunol.*, 151: 6840-6852



Thorens, B., Mermoud, J.J. und Vassalli, P. (1987)

Phagocytosis and inflammatory stimuli induce GM-CSF mRNA in macrophages through post transcriptional regulation

*Cell*, 48: 671-679

Trinchieri, G. und Gerosa F. (1996)

Immunoregulation by Interleukin-12

*Leukoc. Biol.*, 59: 505-511

Valitutti, S., Carbone, A., Castellino, F., Maggiano, N., Ricci, R., Larocca, L.M. und Musiani, P. (1989)

The expression of functional IL-2 receptor on activated macrophages depends on stimulus applied

*J.Immunol.*, 67: 44-50

Vannier, E. und Dinarello, C.A. (1993)

Histamine enhances interleukin (IL)-1-induced IL-1 gene expression and protein synthesis via histamine H-2 receptors in peripheral blood mononuclear cells

*J.Clin.Invest.*, 92: 281-287

Van Voorkis, W.C., Valinsky, J., Hoffman, E., Luban, J., Hai, L.S. und Steinman, R.M. (1983)

Relative efficacy of human monocytes and dendritic cells as accessory cells for T-cell replication

*J. Exp. Med.*, 158: 174-191

Winzler, C., Rovere, P., Reseigno, M., Granucci, F., Penna, G., Adorine, 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: 317-328

Zhou, L.J. und Tedder, T.F. (1995)

Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily

*J. Immunol.* 154, 3821-3301

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

1. Zickler, B., Kniep, E.M., Böker, T. und Emmendorffer, A. (1999)  
Effects of recombinant IL-16 on human monocytes  
*J. Leukoc. Biol.*; Supplement 1999:13 (Abstr.)
  
2. Zickler, B., Kniep, E.M., Böker, T. und Emmendorffer, A. (1999)  
Stimulation of human monocytes and dendritic cells with IL-16  
*Immunobiol.*, 200 (3-5): 576 (Abstr.)
  
3. Kniep, E.M., Zickler, B. und Emmendorffer A. (1999)  
Generation of dendritic cells from monocytes and the effects of IL-16  
*Immunobiol.*, 200 (3-5): 565 (Abstr.)
  
4. Zickler, B., Kniep, E.M. und Emmendorffer, A. (2000)  
Maturation of monocyte derived human dendritic cells with IL-16 is independent from TNF- $\alpha$   
*Immunobiol.*, 203 (1-3): 395-396 (Abstr.)

## Danksagung

Für die Übernahme des Hauptreferates sowie die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Emmendorffer herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Müller danke ich für die Übernahme des Korreferates und die damit verbundene Mühe.

Frau Dr. Kniep danke ich für die geduldige und immerwährende Unterstützung bei der Diskussion aller praktischen und theoretischen Fragen.

Frau Dr. Bernier möchte ich für die Einführung in einige Arbeitsmethoden danken.

Bei allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung Immunologie des Fraunhofer Institutes, möchte ich mich für das freundliche Arbeitsklima und die stete Hilfsbereitschaft ganz herzlich bedanken.

## Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner versichere ich, dass die vorliegende Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, den 2. April 2001

## Lebenslauf

Bianca Zickler

geb. am 05.07.1973 in Hannover

### Schulbildung:

1979-1983	Grundschule Pestalozzistraße in Laatzen
1983-1985	Orientierungsstufe der Albert Einstein Schule in Laatzen
1985-1992	Gymnasium Laatzen
Juni 1992	Abitur

### Hochschulbildung:

Oktober 1992	Studium der Biologie an der Universität Hannover
-Mai 1998	Diplomarbeit in der Abteilung Immunbiologie am Fraunhofer Institut in Hannover bei Herrn Prof. Dr. Emmendorffer
seit Juni 1998	Stipendiantin des Graduiertenkollegs „Charakterisierung von regulatorischen Peptiden und ihrer Zielproteine“ zur Erstellung der Doktorarbeit am Fraunhofer Institut in Hannover, Abteilung Immunbiologie

