

Aus dem Forschungszentrum Borstel

Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften

Programmbereich Asthma und Allergie

Forschungsgruppe Angeborene Immunität

Leiter: Prof. Dr. Holger Heine

**Mechanismen der erhöhten Allergieprotektion durch mikrobielle
Diversität: verändertes Aktivierungsprofil humaner dendritischer
Zellen nach simultaner Behandlung mit verschiedenen
allergieprotektiven Kuhstallbakterien**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Anna Störmer

Kiel, 2016

Erster Gutachter: Prof. Dr. Holger Heine

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Thomas Roeder

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2016

Zum Druck genehmigt: 25.04.2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Einleitung	5
1.1 Asthma und Allergien in Zahlen	5
1.2 Definition von Atopie, Allergie und Asthma	5
1.3 Die verschiedenen Subgruppen der T-Zellen und ihre Rolle bei Allergien	6
1.4 Dendritische Zellen (DCs)	10
1.5 Die verschiedenen Reifestadien von DCs sind mit unterschiedlichen Funktionen verknüpft	12
1.5.1 Unreife DCs als Teil des angeborenen Immunsystems	12
1.5.2 Reife DCs als Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität	15
1.5.3 DCs nehmen eine zentrale Rolle bei der Polarisierung naiver T-Zellen ein	15
1.6 Die Rolle von DCs bei der Entwicklung allergischer Erkrankungen	19
1.7 Risikofaktoren für die Entstehung atopischer Erkrankungen	21
1.8 Die Hygienehypothese	22
1.8.1 Identifizierung und Charakterisierung verschiedener allergieprotektiver Kuhstallisolate	24
1.8.2 Diversitätseffekt	24
1.8.3 Potentielle zelluläre Mechanismen der Hygienehypothese	25
1.9 Zielsetzung der Arbeit	27
2 Material und Methoden	28
2.1 Geräte	28
2.2 Verbrauchsmaterialien	29
2.3 Chemikalien	29
2.4 Puffer und Medien	30
2.5 Stimulantien und Zusätze	31

Inhaltsverzeichnis

2.6	Antikörper.....	31
2.7	Kultivierung und Aufbereitung der Bakterien	32
2.8	Zellkultur.....	33
2.8.1	Kultur, Transfektion und Stimulation von HEK293-Zellen	33
2.8.2	Gewinnung humaner mononukleärer Zellen (MNCs) mittels Dichtegradientenzentrifugation.....	33
2.8.3	Isolierung humaner Monozyten und Lymphozyten mittels Elutriation.....	33
2.8.4	Generierung humaner von DCs aus Monozyten.....	34
2.8.5	Stimulation humaner DCs	34
2.8.6	Kokultur humaner DCs mit autologen, naiven CD4 ⁺ T-Zellen	35
2.8.7	Bestimmung der Zellzahl	35
2.9	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)</i>	36
2.10	Durchfluszytometrie (<i>fluorescence-activated cell sorting, FACS</i>)	36
2.11	Molekularbiologische Methoden	37
2.11.1	Isolierung der Gesamt-Ribonukleinsäure (RNA) und Reverse Transkription (RT)	37
2.11.2	Quantitative <i>Real-time</i> Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)	37
3	Ergebnisse.....	40
3.1	Grundlegende immunmodulatorische Eigenschaften der Gram-positiven Bakterien <i>Jeotgalicoccus psychrophilus</i> W713 und <i>Lactobacillus curvatus</i>	40
3.1.1	Beteiligung verschiedener PRRs an der Zellaktivierung durch <i>Jeotgalicoccus psychrophilus</i> W713 und <i>Lactobacillus curvatus</i>	40
3.1.2	Aktivierung und Reifung humaner DCs durch Stimulation mit <i>Jeotgalicoccus psychrophilus</i> W713 und <i>Lactobacillus curvatus</i>	42
3.2	Einfluss einer Stimulation mit <i>Jeotgalicoccus psychrophilus</i> W713 und <i>Lactobacillus curvatus</i> auf die T-Zell-Polarisierung.....	45
3.2.1	Induktion T _H 1-assoziierter Moleküle.....	45
3.2.2	Induktion T _H 2-assoziierter Moleküle.....	51

Inhaltsverzeichnis

3.2.3	Induktion T_{reg} -assozierter Moleküle	55
3.3	Analyse synergistischer Effekte anhand der Freisetzung verschiedener Schlüsselzytokine nach Stimulation humaner DCs mit den drei Kuhstallbakterien <i>Lactococcus lactis</i> G121, <i>Acinetobacter lwoffii</i> F78 und <i>Staphylococcus sciuri</i> W620.	59
3.4	Analyse der Effekte, die durch simultane Stimulation humaner DCs mit fünf Kuhstallbakterien induziert werden.....	70
3.4.1	Freisetzung von Schlüsselzytokinen	70
3.4.2	Reifungsinduktion humaner DCs.....	77
3.4.3	Einfluss auf die T_H1 -Polarisierung	78
3.4.4	Einfluss auf die T_H2 -Polarisierung	84
3.4.5	Einfluss auf die T_{reg} -Polarisierung.....	88
4	Diskussion	92
4.1	Die allergieprotektive Wirkung des Kuhstallisols <i>Lactobacillus curvatus</i> basiert auf der Induktion einer T_H1 -Polarisierung.....	93
4.2	Das Kuhstallisat <i>Jeotgalicoccus psychrophilus</i> W713 induziert keine eindeutige T_H -Polarisierung	99
4.3	Synergistische Effekte sind nicht verantwortlich für die erhöhte Allergieprotektion, die durch eine höhere Anzahl von Mikroben induziert wird	100
4.3.1	Die simultane Stimulation huDCs mit den drei allergieprotektiven Kuhstallbakterien <i>Lactococcus lactis</i> G121, <i>Acinetobacter lwoffii</i> F78 und <i>Staphylococcus sciuri</i> W620 führt nur teilweise zu einer synergistischen Zytokinfreisetzung.....	100
4.3.2	Die simultane Stimulation huDCs mit fünf allergieprotektiven Kuhstallbakterien führt zu einem im Vergleich zu den Einzelstimulationen vollkommen anderen Induktionsprofil	105
4.3.3	Hypothese zur verstärkten Allergieprotektion durch eine höhere mikrobielle Diversität	112
4.4	Fazit	113
	Zusammenfassung.....	125

Inhaltsverzeichnis

Abstract	127
Abbildungsverzeichnis.....	129
Tabellenverzeichnis.....	132
Anhang	133
Curriculum Vitae.....	137
Veröffentlichungen	138
Danksagung	139
Eidesstattliche Erklärung.....	140

Abkürzungsverzeichnis

A. Iwoffii	<i>Acinetobacter Iwoffii</i> F78
Abb.	Abbildung
AHR	<i>aryl hydrocarbon receptorf</i>
ALEX	<i>allergy and endotoxin</i>
ALI	<i>air-liquid interface</i>
APC	<i>antigen presenting cell</i>
as	<i>anti-sense</i>
B2M	Beta-2 Mikroglobulin
BAL	Broncho-alveoläre-Lavage
BATF	<i>basic leucine zipper transcriptional factor ATF-like</i>
bp	Basenpaare
Bcl-6	<i>B-cell lymphoma 6 protein</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD4⁺	CD4-positiv
cDCs	<i>conventional dendritic cell</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CTLA	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
Da	Dalton
DAP	Diaminopimelinsäure
DC	Dendritische Zelle
DLL4	<i>delta like ligand 4</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat

Abkürzungsverzeichnis

FoxP3	<i>forkhead-box-protein P3</i>
g	Gramm
GABRIELA	<i>multidisciplinary study to identify the genetic and environmental causes of asthma in the European community advanced study</i>
GAPDH	Glyzerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GATA3	<i>GATA-binding protein 3</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophages colony-stimulating factor</i>
h	Stunde(n)
H₂O	Wasser
H₂SO₄	Schwefelsäure
HBSS	<i>hanks buffered salt solution</i>
HDM	<i>house dust mite</i>
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HPRT	Hypoxanthin/Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
hu	human
ICAM	<i>intracellular adhesion molecule</i>
ieDAP	γ -D-Glu-m-2,6-Diaminopimelinsäure
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
imDCs	<i>immature dendritic cells</i>
IRFs	<i>interferon-regulatory factors</i>
<i>J. psychrophilus</i>	<i>Jeotgalicoccus psychrophilus</i> W713
KBE	Kolonie bildende Einheiten
KCl	Kaliumchlorid
KH₂PO₄	Kaliumhydrogenphosphat
Ktr	Kontrolle
l	Liter
LC	Langerhans-Zellen
<i>L. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> G 121
<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>

Abkürzungsverzeichnis

LC	Langerhans-Zelle
LPS	Lipopolsaccharid
LRRs	<i>Leucin-rich repeats</i>
M	molar
MACS	<i>magnetic-activated cell sorting</i>
MAMPs	<i>microorganism-associated molecular patterns</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
MB	<i>marine broth</i>
MDP	Muramyl-Dipeptid (N-Acetyl-muramyl-L-Alanyl-D-iso-Glutamin)
MHCII	<i>major histocompatibility complex class II molecule</i>
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MNCs	mononukleäre Zellen
MRS	<i>deMan, Rogosa and Sharpe</i>
n	nano
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NLR	<i>nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor</i>
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
P₃CSK4	<i>N-palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2R,S)-propyl]-(R)-cysteinyl-seryl-(lysyl)3-lysine</i>
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PARSIFAL	<i>prevention of allergy, risk factors for sensitization related to farming and anthroposophic life</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pDCs	Plasmazytoide DCs
PE	Phycoerythrin
PGK1	Phosphoglycerat Kinase 1
PGN	Peptidoglykan
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PD-1	<i>programmed cell death protein1</i>
RNA	Ribonukleinsäure

Abkürzungsverzeichnis

RORγ/RORα	<i>retinoid-acid receptor-related orphan receptor gamma t /alpha</i>
RPLx	60S ribosomales Protein Lx
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkription
s	<i>sense</i>
<i>S. sciuri</i>	<i>Staphylococcus sciuri</i> CW 620
SB	<i>super broth</i>
SDHA	Succinat Dehydrogenase
TB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
T-bet	<i>t-box expressed in T cells</i>
TBP	<i>tata-binding protein</i>
TCR	<i>t cell receptor</i>
TFs	<i>tissue factors</i>
TGF-β	<i>transforming growth factor</i>
T_H1-Zellen	T _{Helper} 1-Zellen
T_H2-Zellen	T _{Helper} 2-Zellen
T_H-Zellen	T _{Helper} -Zellen
T_{reg}	regulatorische T-Zellen
TIR	Toll/Interleukin-1-Rezeptor Homologie-Domäne
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TSB	<i>tryptic soya broth</i>
U	<i>unit</i>
v/v	Volumen/Volumen
v/w	Gewicht/Volumen
w/o	<i>without</i>

1 Einleitung

1.1 Asthma und Allergien in Zahlen

Immer mehr Menschen leiden an Allergien und zu Recht werden allergische Erkrankungen in den Industrieländern mittlerweile als „Volkskrankheit“ bezeichnet. Gründe hierfür sind nicht nur das hohe Vorkommen in der Bevölkerung, sondern auch die enormen, gesundheitsökonomischen Kosten, die allein für die Europäische Union auf etwa 25 Milliarden Euro pro Jahr geschätzt werden¹. Insbesondere in den Ländern mit westlichem Lebensstil ist die Prävalenz allergischer Erkrankungen seit Mitte des letzten Jahrhunderts stark gestiegen, laut dem Deutschen Allergie- und Asthmabund (www.daab.de) hat sich die Zahl der Allergiker in den letzten drei Jahrzehnten in Deutschland beispielsweise verdreifacht. Während die Häufigkeit von *Asthma bronchiale*, das zu den atopischen Erkrankungen zählt, weiterhin steigt, hat sich die Inzidenz aller anderen Formen der Allergie im letzten Jahrzehnt auf hohem Niveau stabilisiert². Aktuell sind je nach Quelle 20-40 % der Deutschen von mindestens einer Allergie betroffen^{1,2}, weltweit sind es etwa 35 %. Vor allem Kinder sind betroffen, wobei das *Asthma bronchiale* die häufigste Manifestation im Kindesalter darstellt³: Aktuellen Untersuchungen zufolge leiden etwa 650.000 Kinder in Deutschland an dieser allergischen Form des Asthmas¹.

1.2 Definition von Atopie, Allergie und Asthma

Allergien sind chronische Entzündungen an den Grenzflächen des menschlichen Organismus zur Umwelt, die sich in den unterschiedlichsten Erkrankungsformen manifestieren. Allen gemein ist, dass sie auf einer Überreaktion des Immunsystems auf normalerweise harmlose Stoffe der Umwelt, den Allergenen, basieren¹. Die häufigsten Krankheitsbilder sind die allergische Konjunktivitis, allergische Rhinitis und das allergische Asthma, welches die häufigste Form des *Asthma bronchiale* darstellt⁴. Oft fallen diese Krankheitsformen auch unter den Begriff der atopischen Erkrankungen, da ihnen die genetische Prädisposition, auf aerogene, gastrointestinale oder kutane Allergene mit einer gesteigerten Immunglobulin (Ig)E-Bildung zu reagieren (Atopie), zu Grunde liegt. Dieser Antikörper-Isotyp wird vermehrt im Serum betroffener Patienten nachgewiesen und vermittelt die Ausschüttung von u.a. Histamin, Chemo- und Zytokinen. Diese Mediatoren verursachen die typischen Symptome

der allergischen Sofortreaktion, wie erhöhte Mukussekretion, Kontraktion der glatten Muskelzellen und eine erhöhte vaskuläre Permeabilität⁵.

1.3 Die verschiedenen Subgruppen der T-Zellen und ihre Rolle bei Allergien

Im Mittelpunkt der allergischen Reaktion steht eine Subgruppe von T-Lymphozyten, die T-Helfer(T_H)2-Zellen. Die von ihnen freigesetzten Zytokine induzieren nicht nur die Produktion von IgE durch B-Zellen, sie koordinieren zusätzlich auch die Rekrutierung und Aktivierung von weiteren, an der Immunreaktion beteiligten Zellen, wie Mastzellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten⁶. Grundsätzlich werden T-Zellen in zwei Hauptgruppen unterteilt, die *cluster of differentiation* (CD)4-positiven- ($CD4^+$) und $CD8^+$ -T-Zellen. Bei letzteren handelt es sich hauptsächlich um zytotoxische T-Zellen, welche u.a. Virus-infizierte Zellen erkennen und abtöten können⁷. Bei der allergischen Reaktion spielen die T-Helfer(T_H)-Zellen, klassischerweise $CD4^+$, die zentrale Rolle⁶. Alle naiven T_H -Zellen entstammen einer gemeinsamen Vorläuferzelle, doch im Verlauf ihrer Reifung differenzieren sie in Abhängigkeit der Aktivierung durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) zu verschiedenen Effektorzellen (siehe auch 1.5.3, S.15). Die ursprüngliche Klassifizierung in T_H1 - und T_H2 -Zellen wurde bereits 1986 von T. Mosman und R. Coffman aufgrund von Beobachtungen am Mausmodel vorgenommen. Sie entwickelten auch die Hypothese der T_H1 -/ T_H2 -Balance, die besagt, dass sich die beiden Zelltypen gegenseitig regulieren und hemmen können⁸.

T_H1 -Zellen werden als Reaktion auf intrazelluläre Pathogene wie Viren, Parasiten und verschiedene Bakterien⁹ unter dem Einfluss von Interferon gamma (IFN- γ) gebildet. Während der Differenzierung zu T_H1 -Zellen wird die Expression des linienspezifischen Transkriptionsfaktors *T-box expressed in T cells* (T-bet) hochreguliert. T_H1 -Zellen sind vor allem in die zellvermittelte Immunantwort involviert, so erhöhen die vorwiegend von ihnen freigesetzten Zytokine Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), Interleukin (IL)-2 und IFN- γ die Phagozytoseaktivität von Makrophagen und aktivieren zytotoxische Zellen¹⁰. IFN- γ dient dabei durch positive Rückkopplung nicht nur der verstärkten Entstehung weiterer T_H1 -Zellen, gleichzeitig hemmt es auch die T_H2 -Entwicklung¹¹. Regulatorischer Gegenspieler dieses IFNs ist IL-4, welches in großen Mengen von den T_H2 -Zellen freigesetzt wird, und ebenfalls mittels einer positiven Rückkopplung die Entstehung des eigenen Zelltyps fördert¹². Weitere, typischerweise von T_H2 -Zellen sezernierte Zytokine sind IL-5, IL-13 und IL-10, welche nach Aktivierung des T_H2 -spezifischen Transkriptionsfaktors GATA3 translatiert werden. Da diese

Einleitung

Zytokine die vermehrte Antikörper-Produktion durch B-Zellen induzieren, dienen sie vorrangig der humoralen Immunantwort¹². Darüber hinaus sind sie an der Beseitigung extrazellulärer Bakterien und Helminthen beteiligt¹³ und fördern durch die bereits erwähnten Mechanismen die Entstehung allergischer Reaktionen. Auf Basis der von Mosmann und Coffman postulierten Dichotomie der T-Lymphozyten konnten in den Folgejahren zwar einige Fortschritte bei der Aufschlüsselung der T-Zell- Funktion gemacht werden, schnell wurde aber auch deutlich, dass dieses Paradigma die Komplexität der T-Zell-vermittelten Immunregulation nicht vollständig widerspiegelt¹⁴. Nach heutigem Kenntnisstand geht man von mindestens sieben funktionell verschiedenen Untergruppen der CD4⁺-Zellen aus: T_H1-, T_H2-, T_H9-, T_H17-, T_H22, T_{FH} und T_{reg}-Zellen¹⁵ (siehe Abb.1, S.18) . Detaillierte *in vivo* und *in vitro* Studien machen aber auch deutlich, dass jede Subgruppe eine gewisse Plastizität aufweist und ihren Phänotyp in Abhängigkeit des umgebenden Milieus ändern kann¹⁶. Insbesondere den regulatorische T (T_{reg})-Zellen ist in den letzten 20 Jahren große Aufmerksamkeit gewidmet worden. Zwar wurden diese bereits in den 70er Jahren beschrieben, ihre Existenz war aber lange Zeit umstritten¹⁷. Diese immunregulatorischen Zellen stellen eine sehr heterogene Gruppe dar. Nach heutigem Wissenstand geht man von mindestens drei CD4⁺ Phänotypen aus: den natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen (nT_{reg}) und den induzierbaren regulatorische T-Zellen (iT_{reg}), zu denen die T_r1 und die T_H3-Zellen zählen¹⁵. Während nT_{reg} im Thymus generiert werden, können letztere unter Einfluss hoher Konzentrationen von *transforming growth factor beta* (TGF-β) und/oder IL-10 in der Peripherie induziert werden¹⁸. Allen gemein ist, dass sie durch Ausschüttung der immunregulatorischen Zytokine IL-10 (T_r1-Zellen) oder TGF-β (T_H3-Zellen), oder durch Zell-Zell-Kontakte (nT_{reg}-Zellen) die Funktion und Proliferation anderer Immunzellen, darunter auch Effektor-T-Zellen, unterdrücken können¹⁹ (siehe nachstehende Tabelle (Tab.1)).

Tab.1:Übersicht der verschiedenen T_{reg}-Subpopulationen

	natürlich vorkommende T_{reg}	induzierte T_{reg}	
	nT _{reg}	T _r 1	T _H 3
Herkunft	Thymus	Peripherie	Peripherie
FoxP3-Expression	+++	-	? (-/+)
IL-10-Sekretion	+ (<i>in vivo</i>)	+++	+
TGF-β-Sekretion	+	+	+++
Vorrangige Wirkungsweise	Zell-Zell-Kontakt	Freisetzung von IL-10	Freisetzung von TGF-β

Einleitung

Dementsprechend spielen sie auch bei der Entwicklung und Ausprägung allergischer Reaktionen eine zentrale Rolle, sowohl in der Sensibilisierungs- als auch in der Effektorphase: sie besitzen nicht nur die Fähigkeit, die Aktivierung von T_{H2} -, aber auch T_{H1} - und T_{H17} -Zellen zu inhibieren, sondern können bereits die Entwicklungen dieser Phänotypen aus naiven T-Zellen unterdrücken. Gleichzeitig fördern sie die Entwicklung sogenannter tolerogener dendritischer Zellen (DCs)²⁰, semi-reifen Zellen, die eine Toleranz gegenüber aufgenommenen Antigenen vermitteln können²¹. Des Weiteren können T_{reg} -Zellen sich direkt supprimierend auf Mastzellen, basophile und eosinophile Granulozyten auswirken und somit die allergische Reaktion abschwächen²². Während früher davon ausgegangen wurde, dass die supprimierenden Effekte aller T_{reg} -Zellen an die Expression des Linien-spezifischen Transkriptionsfaktors *forkhead box P3* (FoxP3) geknüpft sind, belegen neuere Studien, dass die FoxP3-Expression nicht mit der Suppressoraktivität dieser Zellen korreliert¹⁹. So geht man heute davon aus, dass lediglich die nT_{reg} -Zellen permanent FoxP3⁺ sind, während die T_{r1} -Zellen diesen Transkriptionsfaktor nicht konstitutiv exprimieren können, sondern dessen Expression nur nach Aktivierung hochregulieren. Die Expression in T_{H3} -Zellen wird noch diskutiert²³. Noch vor den T_{reg} -Zellen wurde eine Gruppe von T-Zellen entdeckt, die sich durch Freisetzung großer Mengen des Zytokins IL-17 auszeichnet und folglich als T_{H17} -Zellen bezeichnet wurden. Dominierend ist die Sekretion von IL-17A und IL-17F, daneben werden aber auch IL-21, IL-22 und GM-CSF vermehrt von diesem Zelltyp freigesetzt¹⁶. Aufgrund dieses Zytokinprofils sind T_{H17} -Zellen maßgeblich an der Abwehr extrazellulärer Bakterien und Pilze beteiligt. Sie induzieren aber auch zellzerstörende Entzündungsprozesse und sind an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen beteiligt²⁴. Charakteristisch ist die Expression der Linien-spezifischen Transkriptionsfaktoren *retinoid-acid receptor-related orphan receptor gamma t* und *alpha* (ROR γ t, ROR α)²⁵. Da aber auch die Transkriptionsfaktoren T-bet und GATA3 exprimiert werden, geht man davon aus, dass T_{H17} -Zellen sich reprogrammieren und in T_{H1} -oder T_{H2} -Zellen differenzieren können²⁶. T_{H17} -Zellen scheinen nicht direkt an der Entwicklung des T_{H2} -vermittelten Asthmas mitzuwirken²⁷, aber durch Rekrutierung von Neutrophilen an der Pathogenese des allergischen Asthmas beteiligt zu sein²⁴. Gestützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass in der Lunge, Sputum, Serum und der bronchoalveolären Lavage asthmatischer Patienten eine erhöhte IL-17-Expression nachgewiesen wurde²⁸ und der Schweregrad der Atemwegshyperreakтивität mit der Höhe an gemessenem IL-17 korreliert²⁹.

Einleitung

Phänotypisch und funktionell eng mit den T_{H17} -Zellen verwandt sind die T_{H22} -Zellen. Ihr namengebendes Zytokin, ein Mitglied der IL-10-Familie, kann zwar von einer Reihe von aktivierten T-Zellen freigesetzt werden, aber anders als beispielsweise T_{H17} -Zellen sezernieren T_{H22} -Zellen große Mengen dieses Proteins unter Abwesenheit von IL-17, IL-4 oder IFN- γ , weshalb sie als eigenständige Untergruppe klassifiziert wurden. Ihr Leitzytokin wird unter Einfluss des Transkriptionsfaktors *aryl hydrocarbon receptor* (AHR) gebildet und spielt eine zentrale Rolle bei der Wundheilung und der Abwehr invasiver Pathogene an den epithelialen Grenzflächen, insbesondere in der Haut und der Lunge¹⁶. Auch wenn die Rolle dieses T-Zells subtyps bei allergischen Erkrankungen bisher noch nicht ganz geklärt ist, scheint sie sich in der frühen Phase der asthmatischen Reaktion eher positiv und gewebsschützend auszuwirken³⁰. Zudem zeigte sich in einem Mausmodell, dass IL-22 die Induktion der allergischen Entzündungsreaktion begrenzen kann³¹.

Ebenfalls an der mukosalen Immunabwehr, Gewebsentzündungen und an der Abwehr von Helminthen beteiligt sind die erst vor kurzem charakterisierten T_{H9} -Zellen. Obwohl sie sich unter ähnlichen Differenzierungssignalen wie T_{H2} -Zellen entwickeln und sich unter Anwesenheit von TGF- β auch aus diesen generieren lassen³², sekretieren sie keine T_{H2} -Zytokine. Da sie auch keine anderen Leitzytokine, wie IFN- γ , IL-17 oder IL-22, freisetzen, sondern neben der großen Produktionskapazität von IL-9 lediglich noch die Fähigkeit besitzen, IL-10 freizusetzen, wurden diese als eigenständige Subgruppe definiert. Die Expression des Transkriptionsfaktors PU.1 führt zur Konvertierung von T_{H2} zu T_{H9} Zellen, weshalb dieser als Master-Regulator des T_{H9} -Phänotyps angesehen wird³³. Da die IL-9-Produktion unter diesem aber limitiert ist, wird in der Literatur auch der Transkriptionsfaktor *Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like*, kurz BATF, als Linien-spezifischer Marker vorgeschlagen, insbesondere, da dessen Expression zu einer erhöhten Produktion von IL-9 und IL-10 führt³³. Während die Rolle der T_{H9} -Zellen bei der Entwicklung allergischer Entzündungsreaktionen noch ungeklärt ist³⁴, beziehungsweise negiert wird³⁵, ist die Beteiligung dieses Phänotyps an der Pathophysiologie allergischer Reaktionen unumstritten³⁴. So ist IL-9 an den zentralen, mit einer allergischen Entzündungsreaktion einhergehenden zellulären Vorgängen, welche die typische Pathophysiologie der Allergie hervorrufen, maßgeblich beteiligt, u.a. an der eosinophilen Entzündungsreaktion, der bronchialen Hyperreaktivität, der erhöhten Mukusproduktion und der Erhöhung des IgE-Spiegels. Des Weiteren beeinflussen diese proinflammatorischen Lymphozyten eine Reihe

verschiedener Zelltypen, die an der Ausprägung des asthmatischen Phänotyps beteiligt sind. Beispielsweise können sie die Überlebens- und Proliferationsrate von T-Zellen, B-Zellen, Mastzellen, eosinophile Granulozyten und Epithelzellen steigern³⁶. Im Einklang hiermit steht der Befund, dass im Blut allergischer Patienten eine deutlich höhere Anzahl an T_{H9} -Zellen zirkuliert, als im Blut nicht-allergischer Spender³⁷.

Erst Anfang 2000 wurde ein $CD4^+$ T-Zelltyp entdeckt, der aufgrund seiner follikulären Lokalisation als follikuläre $T_{Helper}(T_{FH})$ -Zellen³⁸ bezeichnet wird. Diese regen nicht nur B-Zellen zur Produktion von hochaffinen Antikörpern an, sondern führen durch Beteiligung an Prozessen der somatischen Hypermutation, der Affinitätsreifung und des Klassenwechsels zur Erzeugung von Gedächtnis-B-Zellen und langlebigen Plasmazellen³⁹. Neben IL-21 produzieren diese Zellen IL-4 und IL-10⁴⁰ und lassen sich anhand der Expression des Chemokinrezeptors CXCR5, des Transkriptionsfaktors *B-cell lymphoma 6 protein* (Bcl-6) und des inhibierenden Moleküls *programmed cell death protein 1* (PD-1) charakterisieren⁴¹. Aufgrund ihrer zentralen Funktion bei der Kontrolle der humoralen Immunantwort könnten T_{FH} -Zellen auch zur Entwicklung von Allergien beitragen, wobei diesbezügliche Untersuchungen erst am Anfang stehen³⁸.

1.4 Dendritische Zellen (DCs)

Das vorangegangene Kapitel hat deutlich gemacht, dass die verschiedenen T_H -Zellantworten die Art und den Verlauf einer Immunreaktion und damit auch von Allergien maßgeblich bestimmen. Allerdings sind sie nicht in der Lage, native Antigene eigenständig zu erkennen und aufzunehmen und so eine angemessene Immunantwort zu induzieren. Stattdessen müssen eingedrungene Antigene von sogenannten Antigen-präsentierende Zellen (APCs) aufgenommen, prozessiert und den T-Zellen über den MHC (*major histocompatibility complex*) II-Komplex präsentiert werden⁴². Die wichtigsten Vertreter der APCs sind die dendritischen Zellen, auch als „professionelle“ APCs bezeichnet⁴³. Während alle APCs, also auch Monozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten, imstande sind, Antigene aufzunehmen und zu präsentieren, sind DCs die einzigen mit der Fähigkeit, die adaptive Immunantwort durch Aktivierung naiver T-Lymphozyten in Gang zu setzen⁴⁴, weshalb sie häufig auch als „Brücke“ zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort bezeichnet werden.

Während des Vorganges der Antigenpräsentation können die DCs über mehrere Faktoren die Differenzierungsrichtung der naiven T-Zellen steuern (siehe folgende Abschnitte).

Einleitung

DCs übernehmen also nicht nur eine Schlüsselrolle als Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort, sondern initiieren und polarisieren letztere auch⁴⁵.

Ursprünglich wurden DCs 1868 von Paul Langerhans in der Epidermis entdeckt. Aufgrund ihrer besonderen Morphologie wurden die fortan nach ihrem Entdecker benannten Langerhans-Zellen (LC) fälschlicherweise als eine Art von Neuronen verstanden⁴⁶. Erst über ein Jahrhundert später, nach Entdeckung dieser Zellen in der Milz von Mäusen, wurden diese als weiße, mit Monozyten und Makrophagen verwandte Blutzellen identifiziert und aufgrund ihrer vielen astartigen Ausläufer nach dem griechischen Ausdruck „dendros“ (Baum) als „dendritische Zellen“ bezeichnet⁴⁷. In den Folgejahren trugen besonders die Bemühungen von Ralph M. Steinmann, dem Entdecker der DCs, zum Verständnis der Funktion dieser spezialisierten Zellen und ihrer Rolle in der adaptiven Immunität bei. Im Jahre 2011 wurden seine diesbezüglichen Leistungen mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin gewürdigt.

Mittlerweile wurden DCs außer in allen lymphatischen Organen⁴⁷, auch in diversen nicht-lymphatischen Organen, u.a. in der Haut (LC), dem Blut⁴⁸, der Lunge und dem Intestinaltrakt⁴⁹ lokalisiert. Dendritische Zellen stellen nach heutigem Kenntnisstand eine sehr heterogene Gruppe dar. Da eine einheitliche Nomenklatur bisher fehlt, und sich die Phänotypen aufgrund ihrer Lokalisation, ihres Entwicklungsursprungs, ihrer Oberflächenmarker, ihrer kostimulatorischen Moleküle und ihrer Rezeptoren unterscheiden können⁵⁰, ist die Zuordnung oft verwirrend. Grob lassen sich die verschiedenen DC-Populationen aber anhand der Expression des Transmembranproteins CD11c in zwei Hauptgruppen unterscheiden: konventionelle, oder auch klassische DCs (cDCs) und plasmazytoide DCs (pDCs)⁵¹. Die CD11c-negativen (CD11c⁻) pDCs zeichnen sich außerdem durch eine schwache Expression des MHCII-Komplexes aus. Da Antigene der Außenwelt nur über MHC-Moleküle präsentiert werden können, besitzen pDCs folglich eine vergleichsweise geringe antigenpräsentierende Kapazität. Mit Hilfe ihrer Rezeptorausstattung erkennen sie jedoch virale Produkte und induzieren deren Abwehr durch Freisetzung großer Mengen von Typ-1-IFN⁵².

Von den pDCs grenzen sich die cDCs durch eine starke Expression von CD11c und MHCII auf ihrer Oberfläche ab. Nach ihrer Reifung setzen sie diverse inflammatorische Zytokine frei und induzieren effektiv die Proliferation und Polarisierung naiver CD4⁺-Zellen⁵¹. Anhand der Oberflächenmarker CD16, CD1c, und BDCA-3 kann eine weitere Untergliederung der cDCs

vorgenommen werden⁵³. Ursprünglich wurden die cDCs als myeloide DCs (mDCs) bezeichnet, da sie sich aus myeloiden Vorläuferzellen entwickeln und sich somit ontogenetisch von den pDCs unterscheiden, welche lymphoiden Vorläuferzellen entstammen. Doch die Befunde verschiedener Gruppen haben mittlerweile deutlich gezeigt, dass die Vorläuferzelle nicht automatisch den finalen DC-Phänotyp bestimmt, da sowohl aus isolierten lymphoiden als auch myeloiden Progenitor-Zellen beide Subgruppen entstehen können⁵⁴. Während die bisher genannten DCs sich alle aus hematopoetischen, CD34⁺-Stammzellen entwickeln, existieren neben diesen „steady-state“ DCs noch Zellen, die sich unter inflammatorischen Bedingungen aus Monozyten entwickeln, die je nach Quelle als Monozyten⁵¹ oder DCs⁵⁵ bezeichnet werden. *In vitro* lassen sich Monozyten-generierte DCs (moDCs) unter Anwesenheit von IL-4 und *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) generieren⁵⁶, so auch für die vorliegende Arbeit. Auch wenn moDCs einige Merkmale, wie die Expression von MHCII und CD11b, mit cDCs gemeinsam haben, darf nicht außer Acht gelassen werden, dass es sich dennoch um eine eigenständige Zellpopulation handelt, deren Genexpressionsprofil insgesamt deutlich mehr dem von Monozyten denn dem der cDCs gleicht⁵¹.

1.5 Die verschiedenen Reifestadien von DCs sind mit unterschiedlichen Funktionen verknüpft

1.5.1 Unreife DCs als Teil des angeborenen Immunsystems

Als Vermittler der Immunität haben DCs zwei zeitlich und phänotypisch klar voneinander abgegrenzte Funktionen, die mit ihrem Reifegrad korrelieren: Im unreifen Zustand (imDCs) sind sie für die Aufnahme und Prozessierung von Fremdantigenen, die Aufnahme von apoptotischen Zellen^{57,58}, sowie die Toleranzinduktion gegenüber Eigenantigenen zuständig. Reife DCs hingegen verlieren diese Fähigkeit, bewirken aber durch Expression verschiedener Moleküle eine effektive und Antigen-spezifische T-Zellantwort⁵⁹. Folglich zeigen imDCs eine hohe phagozytotische Aktivität und weisen nur eine geringe Oberflächenexpression von MHCII-Komplexen und weiteren, für die T-Zell-Aktivierung notwendigen Ko-Rezeptoren auf⁴². Entsprechend ihrer Funktion als „Wächter“ bilden sie in nahezu allen peripheren Geweben des Körpers ein dichtes Netzwerk und patrouillieren permanent durchs Blut. Dort analysieren sie ihre Umgebung, indem sie extrazelluläre Bestandteile durch verschiedene Mechanismen, darunter Phagozytose⁶⁰, Makropinozytose und Rezeptor-vermittelte

Einleitung

Endozytose aufzunehmen⁶¹. Doch nur bei gleichzeitiger Erkennung eines exogenen Gefahrensignals werden die DCs zur Wanderung und gleichzeitiger Reifung in die drainierenden Lymphknoten veranlasst, um dort in T-Zell-Arealen naive T-Zellen zur Proliferation und Differenzierung anzuregen⁶². Neben verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen und T-Zell-abhängigen Signalen führt auch die antigenunabhängige Erkennung viraler oder bakterieller Produkte zur Reifung der DCs⁴⁵. Zur Erkennung konservierter mikrobieller Strukturen, sogenannter PAMPs oder auch MAMPs (*pathogen-/microorganism-associated molecular patterns*), z.B. Membranbestandteile oder Nukleinsäurestrukturen, sind DCs mit einer Reihe von keimbahnkodierten und evolutionär konservierten Mustererkennungsrezeptoren, den PRRs (*pattern recognition receptors*), ausgestattet. Zu diesen zählen u.a. die *Scavenger*-Rezeptoren⁶³ und die hoch konservierten *Toll-like* Rezeptoren (TLRs), die bisher am besten charakterisierten PRRs. Bei TLRs handelt es sich um Typ-I-Transmembranproteine, die durch eine extrazelluläre Domäne aus zahlreichen Leucinreichen Motiven (*leucin rich repeats*, LRR) und einer zytoplasmatischen Signal-Domäne, welche eine so genannte Toll/Interleukin-1-Rezeptor Homologie-Domäne (TIR) enthält, charakterisiert sind⁶⁴. Bis heute wurden im Menschen zehn funktionelle Formen identifiziert⁶⁵, die jeweils auf unterschiedliche mikrobielle Strukturen reagieren und auch zellulär unterschiedlich lokalisiert sind. So erkennen TLR1 und TLR6 -jeweils als Heterodimere mit TLR2- eine Reihe von PAMPs Gram-positiver Bakterien, darunter Lipoproteine und Lipomannan⁶⁶. Wie TLR4, der hauptsächlich an der Erkennung des Lipopolysaccharids (LPS) Gram-negativer Bakterien beteiligt ist, und TLR5, der bakterielles Flagellin detektiert, werden diese Rezeptoren auf der Zelloberfläche exprimiert⁶⁷. Die TLRs 7,8 und 9 hingegen sind in der endosomalen Membran verankert. Sie erkennen verschiedene Formen von Nukleinsäuren, wie einzelsträngige (TLR7 und TLR8) oder doppelsträngige Ribonukleinsäure (RNA, TLR3), sowie unmethylierte Desoxyribonukleinsäure (DNA) und CpG-Oligonukleotide (TLR9). Ihre Aktivierung ist in starkem Maße von der endosomalen Ansäuerung abhängig⁶⁸. Die verschiedenen DC-Subtypen unterscheiden sich in ihrem TLR-Expressionsmuster:

während pDCs hauptsächlich TLR7 und TLR9 exprimieren⁶⁹, besitzt die Fraktion der CD11c⁺-DCs das komplementäre Set von TLRs (TLR2-6 und TLR8)⁷⁰, exprimiert vorrangig aber TLR3^{67,68}. Da TLRs entweder an der Zelloberfläche oder der Membran von Lysosomen oder Endosomen lokalisiert sind, sind sie nicht in der Lage, Pathogene zu detektieren, die in das

Einleitung

Zytosol eingewandert sind. Diese Funktion wird von einer Reihe zytoplasmatischer PRRs wahrgenommen, zu denen die Familie der *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD)-*like* Rezeptoren (NLRs) gehört. Von den bisher beschriebenen 23 Mitgliedern im humanen System⁷¹ sind die bekanntesten Vertreter NOD1 und NOD2. Beide nehmen Moleküle wahr, die während der Synthese oder der Degradation des Peptidoglykans (PGN) der Zellwand Gram-positiver und -negativer Bakterien entstehen⁷². So ist die minimale Struktur, die von NOD2 erkannt wird, das Muramyldipeptid (MDP), eine konservierte Struktur, die in nahezu allen PGN vorkommt⁷³. NOD1 hingegen wird nur durch Peptidoglykanstrukturen aktiviert, in denen die Aminosäure *meso*-Diaminopimelinsäure (*meso*-DAP) vertreten ist. Solche PGN-assozierten Moleküle werden vor allem von Gram-negativen und einigen bestimmten Gram-positiven Bakterien produziert⁷⁴. Auch wenn sich NLRs und TLRs hinsichtlich ihrer nachgeschalteten Signaltransduktionswege und beteiligten Adaptermoleküle stark unterscheiden, induziert deren Aktivierung ähnliche Signalkaskaden. Nach verschiedenen Phosphorylierungsschritten und der damit verbundenen Aktivierung intrazellulärer Kinasen münden diese alle entweder in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B oder anderen, durch *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) aktivierten Transkriptionsfaktoren, welche daraufhin in den Zellkern translozieren und dort die Genexpression verschiedener Chemokine und Zytokine regulieren⁷⁵. Während eine Aktivierung von TLRs aufgrund der Translokation von Transkriptionsfaktoren der Familie der *interferon-regulatory factors* (IRFs) des Weiteren zur Freisetzung von Typ-I-IFNs führen kann⁷⁶, tragen einige Vertreter der NLR-Familie zur Aktivierung der Inflammasomen bei⁷⁷.

1.5.2 Reife DCs als Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität

Die Aktivierung der verschiedenen Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, entweder direkt durch Erkennung von PAMPs oder indirekt durch in der Umgebung vorhandene Signale⁷⁸, veranlasst die Migration von imDCs in die lymphatischen Organe. Hierbei ist noch unklar, ob die Aufnahme des Antigens der TLR-Aktivierung vorausgeht oder simultan beziehungsweise anschließend stattfindet⁶². Während dieser durch Chemokine vermittelten Migration durchlaufen die DCs einen Reifungsprozess. Dieser bringt nicht nur morphologische, sondern auch funktionelle Veränderung mit sich, der Status der DCs wechselt von Antigen-aufnehmenden zu Antigen-präsentierenden Zellen⁴⁵. Während ihrer Reifung verlieren die DCs ihre Phagozytoseaktivität, stattdessen werden die zur Antigenpräsentation notwendigen MHC-Peptidkomplexe vermehrt gebildet und mit den prozessierten Antigenen an die Zelloberfläche transportiert⁷⁹. Gleichzeitig kommt es zu einer verstärkten Expression von kostimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86⁶². Während Rezeptoren für inflammatorische Zytokine herunterreguliert werden, wird der Chemokin-Rezeptor CCR7 verstärkt exprimiert, wodurch die Migration der DCs in die Lymphknoten gewährleistet wird⁴⁵.

1.5.3 DCs nehmen eine zentrale Rolle bei der Polarisierung naiver T-Zellen ein

Im gereiften Zustand liefern DCs drei zur Ausprägung einer protektiven Immunantwort essentielle Signale, die (gleichzeitig) einen entscheidenden Einfluss darauf haben, welche Art von Effektorzellen sich aus naiven CD4⁺-Zellen entwickeln (siehe Abb.1, S.18). Das erste Signal stellt die Präsentation antigener Strukturen auf MHCII-Molekülen gegenüber ungeprägten T-Zellen dar. Dabei kommt es aber nur zu einer Aktivierung und damit einhergehender Differenzierung, wenn eine naive T-Zelle den für das präsentierte Antigen passenden T-Zell-Rezeptor (TCR) trägt (nach dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“). Hierbei kann sowohl die Stärke des TCR-Signals als auch die Art und Menge des Antigens Einfluss auf die Differenzierungsrichtung der ligierten T-Zelle nehmen⁷⁸. Das zweite, Antigen-unabhängige Signal stellt die Interaktion von kostimulatorischen Molekülen auf der Oberfläche von DCs mit CD28, welches konstitutiv auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert wird, dar. Nur wenn die T-Zellen während der MHCII-Präsentation eines passenden Antigens auch eine Kostimulation durch die DCs erfahren, kommt es zur Auslösung einer Immunantwort (Zwei-Signal-Hypothese)⁸⁰.

Einleitung

Ein schwaches oder gar fehlendes kostimulatorisches Signal, beispielsweise aufgrund nicht voll ausgereifter DCs, führt zur Toleranz oder Anergie gegenüber dem präsentierten Antigen⁸¹. Liganden des CD28, die auf DCs exprimiert werden, sind CD80 (auch B7-1) und CD86 (B7-2), beides Mitglieder der B7-Familie⁸². Ein weiteres, zentrales, von DCs geliefertes, kostimulatorisches Molekül ist CD40. Eine Interaktion mit dem auf T-Zellen lokalisierten CD40-Liganden (CD40L, auch CD154), dient nicht nur der Kostimulation, sondern wirkt sich gleichzeitig als Teil der DC-Reifung fördernd auf die Antigenpräsentation sowie das Priming naiver T-Zellen aus⁸³. Des Weiteren führt die Ligation zur Hochregulation von MHCII-, sowie CD80- und CD86-Molekülen, wobei die Induktion der letzten beiden stark vom CD40/CD40L-Signalweg abhängig zu sein scheint⁸⁴. Die Expression der jeweiligen kostimulatorischen Moleküle ist differentiell und wird maßgeblich davon beeinflusst, welche Antigene zur Aktivierung der DCs geführt haben⁸⁵. Auch über diesen Mechanismus können DCs die Ausdifferenzierung der T-Zellen in verschiedene Richtungen steuern. Darüber hinaus liefern reife DCs zusätzliche (dritte) Signale, welche die Polarisierungsrichtung naiver T-Zellen maßgeblich beeinflussen. Neben ihrem spezifischen Zytokinprofil zählt auch ein variables Repertoire von verschiedenen Adhäsions- und weiteren kostimulatorischen Molekülen zu diesen T_H-Zell-polarisierenden Mediatoren⁸⁶. Zwei dieser polarisierenden Oberflächenmoleküle sind Teil des Notch-Signalweges. So führt die Bindung des von DCs exprimierten Notch-Liganden Jagged-1 an seinen auf T-Zellen lokalisierten Rezeptor zu einer T_H2-Polarisation, während eine Bindung von Notch an *delta-like ligand 4* (DLL4) eine T_H1-Ausrichtung begünstigt⁸⁷. Auch die Bindung an das Adhäsionsmolekül *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1), welches ebenfalls als Kostimulator für T-Zellen fungieren kann, favorisiert die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen in Richtung T_H1⁸⁸. Ein weiteres Ligand-Rezeptor-Paar, das Einfluss auf die Ausdifferenzierung naiver T-Zellen ausübt, ist OX40-L/OX40. Während ursprünglich davon ausgegangen wurde, dass die OX40-Kostimulation über Induktion der IL-4-Sekretion die Entwicklung von T_H2-Zellen fördert⁸⁹, wird mittlerweile angenommen, dass die Wirkung dieser Kostimulation eher auf einer allgemeinen Förderung der Expansion geprimter T_H2-Zellen, denn auf einer Polarisierung per se basiert⁹⁰. Eine noch bedeutendere Rolle bei der Beeinflussung der T-Zell-Differenzierung spielt das umgebende Zytokinmilieu, welches vorrangig durch die Antigen-präsentierenden DCs bestimmt wird. Welche Zytokine von DCs freigesetzt werden, hängt wiederum maßgeblich davon ab, welche PRRs an ihrer Aktivierung beteiligt waren, sprich, welche Pathogene detektiert wurden.

Einleitung

So ist sichergestellt, dass dem breiten Spektrum von Pathogenen durch Induktion spezialisierter T_H -Zellen gezielt entgegengewirkt werden kann. Als Antwort auf intrazelluläre Pathogene wie Viren oder *Mycobacterium tuberculosis* (TB) produzieren reifende DCs IFN- α/β und das zur IL-12-Familie gehörende Zytokin IL-12p70. Diese fördern die Differenzierung naiver $CD4^+$ -T-Zellen zu IFN- γ -produzierenden T_{H1} -Zellen⁹¹. Während IL-12 für die Entwicklung von T_{H1} -Zellen unabdingbar ist, vermittelt IL-18, ein Zytokin der IL-1 Familie, alleine keine T_{H1} -Polarisation, sondern nur in Synergie mit IL-12p70⁹². Auch das ebenfalls zur IL-12-Familie zählende IL-27 kann zumindest im frühen Stadium der T-Zell-Polarisation (anders als in der späten Phase der T_{H1} -Antwort) eine T_{H1} -Differenzierung begünstigen und wirkt sich dadurch supprimierend auf die Entwicklung von T_{H2} - und T_{H17} -Zellen aus⁹³. Wie an Knockout-Mäusen gezeigt werden konnte, ist das dritte der vier IL-12-Mitglieder, IL-23, nicht an der Regulation der T_{H1} -Polarisation beteiligt⁹⁴. Vielmehr ist dieses Peptidhormon einer der essentiellen Faktoren bei der Expansion und Erhaltung der T_{H17} -Zellen⁹⁵. Ebenfalls an der Entstehung von T_{H17} -Zellen beteiligt sind die beiden Zytokine TGF- β und IL-6. Diese werden als Reaktion auf den Kontakt mit extrazellulären Bakterien und Pilzen in großen Mengen freigesetzt⁹⁶. In Bezug auf die T-Zell-Polarisation haben sie unterschiedliche Wirkungen, welche stark von der An- und Abwesenheit weiterer Zytokine abhängen: So führt das gleichzeitige Vorhandensein beider Zytokine unter zusätzlicher und anhaltender Anwesenheit von IL-23 und/oder IL-21⁹⁷ zur Entwicklung von T_{H17} -Zellen⁹⁸. In Abwesenheit von IL-6 hingegen führt TGF- β zur Generierung von induzierten T_{reg} -Zellen (iT_{reg}), ein Prozess an dem auch IL-2 beteiligt zu sein scheint⁹⁹. Im Zusammenhang mit T_{reg} -Zellen ist unbedingt das immunregulierende Zytokin IL-10 zu nennen. Dieses wirkt sich nicht nur durch direkte Induktion verschiedener, regulatorischer Subpopulationen von T-Zellen immunsupprimierend aus, sondern entfaltet seine hemmende Wirkung auch durch Inhibition der Proliferation und Differenzierung von T_{H1} - und T_{H2} -Zellen^{100,101}. Letztere entstehen aus naiven T-Zellen, wenn sie in einem IL-4-reichen Milieu aktiviert werden¹⁰², bei gleichzeitiger Anwesenheit von TGF- β hingegen kommt es zur Entstehung von T_{H9} -Zellen¹⁰³.

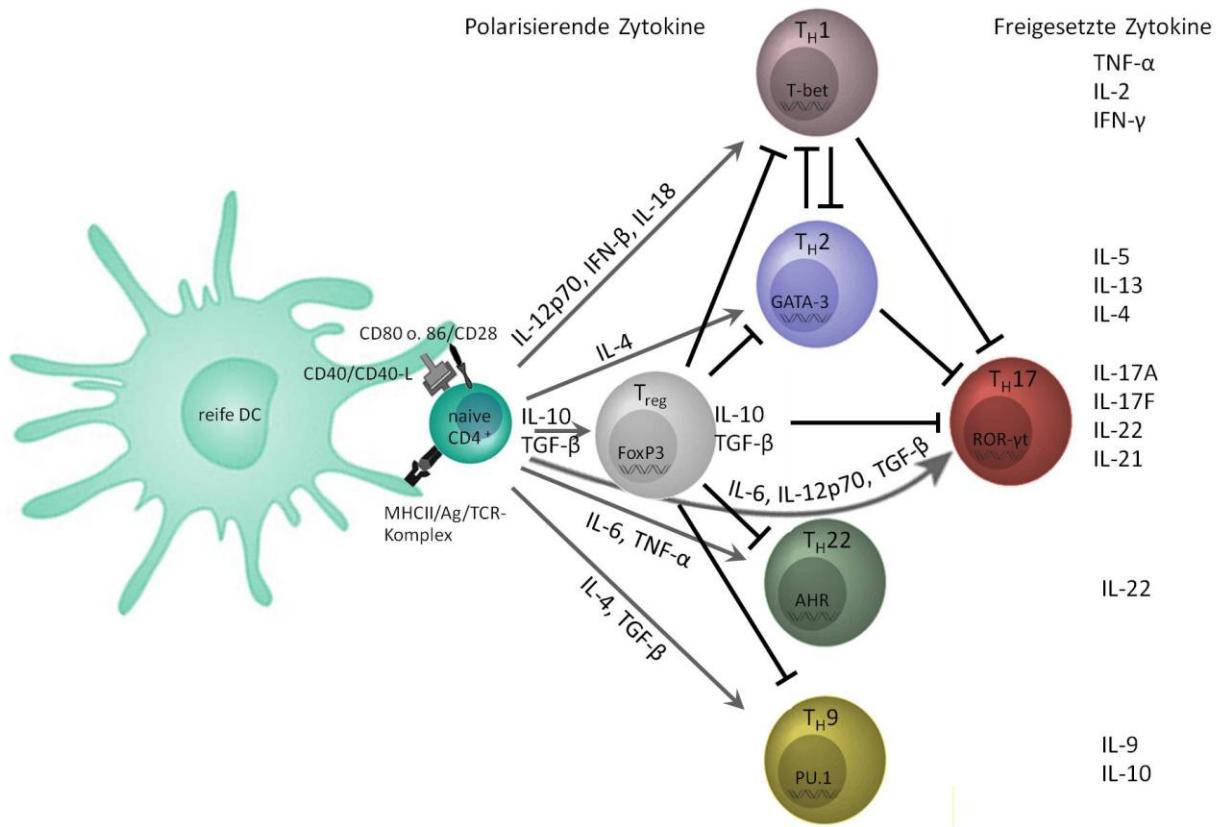


Abb.1: T-Zell-Aktivierung und -Polarisierung durch DCs.

Erläuterungen siehe Text.

CD, cluster of differentiation; **L**, Ligand; **TCR**, T-Zell-Rezeptor; **MHCII**, major histocompatibility complex II; **Ag**, Antigen; **IL**, Interleukin; **IFN**, Interferon; **TGF**, transforming growth factor; **T_{reg}**, regulatorische T-Zelle; **FoxP3**, forkhead box P3; **T_H**, T_{Helper}-3 Zelle; **TNF**, tumor necrosis factor; **T-bet**, T-box expressed in T cells; **GATA3**, GATA-binding protein 3; **AHR**, aryl hydrocarbon receptor; **ROR γ t**, retinoid-acid receptor-related orphan receptor gamma t.

Anders als früher angenommen ist die Kapazität der verschiedenen Subtypen von DCs, T_H-Zellen zu polarisieren, nicht aufgrund ihres Entwicklungsursprungs vorprogrammiert⁴⁴. Vielmehr geht man mittlerweile davon aus, dass naive DCs auf sehr flexible Weise auf Pathogene reagieren und dass dieser Vorgang stark davon abhängig ist, welche PRRs nicht nur zur Aktivierung der DCs, sondern auch der umliegenden Gewebe und Immunzellen geführt haben¹⁰⁴. Zwar polarisieren cDCs naive T-Zellen vorwiegend in Richtung eines T_{H1}-Typs, während pDCs vorrangig eine T_{H2}-Polarisation induzieren¹⁰⁵, dennoch gibt es mittlerweile hinreichend Daten, die zeigen, dass die T_H-polarisierenden Kapazitäten von DCs nicht statisch sind, sondern, dass die verschiedenen Subtypen T_{H1}-, T_{H2}- oder T_{reg}-induzierende Phänotypen annehmen können. Eine Reihe von *in vitro* Studien haben gezeigt, dass die Expressionshöhe der von DCs bereitgestellten T_H-polarisierenden Mediatoren stark von den Bedingungen bestimmt werden, die während ihrer initialen, Reifungs-induzierenden

Aktivierung vorherrschen. Diese wiederum werden maßgeblich von den eindringenden Pathogenen, die es zu bekämpfen gilt, anhand spezifischer Moleküle und Strukturmotive (PAMPs) definiert. Indem sie spezifische PRR-Aktivierungsmuster induzieren, wirken sich diese zum einen direkt auf die Polarisation von imDCs aus. So bedingen mikrobielle Strukturen von *Toxoplasma* und *Mycobacterium* eine IL-12p70-Freisetzung durch DCs, verschiedene Hefen führen zu vornehmlich IL-10-produzierenden DCs¹⁰⁴, wohingegen Bestandteile aus pathogenen Würmern T_H2-polarisierende DCs induzieren¹⁰⁶. Zum anderen nehmen Pathogene auch indirekt Einfluss auf die Induktionseigenschaften von DCs, denn ihre Anwesenheit veranlasst auch umliegende Gewebs- und Immunzellen, darunter Epithelzellen, Mastzellen und Makrophagen, zur Freisetzung eines breiten Spektrums von Inflammations-assoziierten Gewebsfaktoren. Typische „Typ1-Gewebsfaktoren“ sind beispielsweise Typ-1 und 2-IFNs sowie IL-18¹⁰⁷. Die *in vitro* Exposition reifender moDCs mit Histamin oder Prostaglandin E₂ hingegen führt zu T_H2-fördernden DCs¹⁰⁸ und unter Einfluss von IL-10 und TGF-β konvertieren DCs zu T_{reg}-polarisierenden Zellen⁷⁸. Dennoch ist die Flexibilität der DCs begrenzt und darüber hinaus gibt es noch eine Reihe anderer Faktoren, welche die T_H-induzierenden Eigenschaften imDCS maßgeblich beeinflussen. So gibt es Daten, die belegen, dass auch das zahlenmäßige Verhältnis von DCs und TCs in diesem Kontext eine Rolle spielt¹⁰⁹. Zudem ist auch die Menge des detektierten Antigens und die - teils daraus resultierende - Stärke und Dauer der TCR-Ligation von Bedeutung⁷⁸. Die bisher genannten Faktoren nehmen alle direkt oder indirekt Einfluss auf die Reifung der DCs und auch der Aktivierungsgrad der DCs während der Antigen-Präsentation ist entscheidend für die Gewichtung der resultierenden Effektorzell-Population. So lösen unreife oder semi-reife DCs aufgrund ihrer geringen kostimulatorischen Kapazität eine Toleranz, beziehungsweise Anergie in den T-Zellen gegenüber dem präsentierten Antigen aus und nur voll ausgereifte DCs mit starkem kostimulatorischen Potential sind in der Lage, eine Antigen-spezifische, effiziente, T-Zell vermittelte Immunantwort auszulösen¹¹⁰.

1.6 Die Rolle von DCs bei der Entwicklung allergischer Erkrankungen

In Normalfall löst die Inhalation eines apathogenen Antigens keine Immunantwort, sondern Toleranz aus¹¹¹. Die genauen Mechanismen, die stattdessen zu einer aberranten Immunreaktion führen, sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Basierend auf einer Reihe

von experimentellen Befunden ist aber unumstritten, dass DCs sowohl bei der Entstehung als auch der Pathologie des allergischen Asthmas eine zentrale Rolle spielen¹¹².

Die mit allergischen Asthma einhergehende erhöhte Konzentration Allergen-spezifischer IgE-Antikörper reflektiert eine überschießende T_{H2} -basierte Immunantwort gegenüber Aeroallergenen¹¹³, wobei eine direkte Korrelation zwischen der Zahl der T_{H2} -Zellen und dem Schweregrad der Erkrankung besteht¹¹⁴. Ein ganz entscheidendes Argument für die bedeutende Rolle von DCs bei der Asthmaentstehung ergibt sich daraus, dass es, wie soeben beschrieben, vornehmlich DCs sind, die die Polarisation von T_H -Zellen kontrollieren und lenken. So konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass DCs atopischer Patienten bevorzugt T_{H2} -Zellen induzieren, während DCs gesunder Spender eher eine T_{H1} -Polarisation hervorrufen¹¹⁵. Doch nicht nur aufgrund ihrer zentralen Rolle bei der Auslösung und Polarisierung einer adaptiven Immunantwort stellen DCs in Hinblick auf das allergische Asthma die wesentlichen APCs dar, wie nachstehende Befunde untermauern: Einhergehend mit ihrer Funktion, den menschlichen Körper laufend auf eindringende Fremdkörper zu untersuchen, sind sie an allen Stellen zu finden, die einer hohen Antigen-Belastung ausgesetzt sind. So sind sie neben der Haut und der Niere auch sehr zahlreich in den mukosalen Grenzflächen vertreten, darunter auch in denen der Lunge⁴⁶, dem zentralen Organ des allergischen Asthmas. Dort bilden sie ein dichtes Netzwerk, das sich sowohl durch die oberen Schichten des Atemwegsepithels als auch durch die Lamina propria zieht und darauf ausgelegt ist, direkten Kontakt zu eingeatmeten Antigenen aufzunehmen^{116,117}. Des Weiteren weisen Asthmatiker generell im Vergleich zu gesunden Testpersonen eine deutlich höhere Gesamtzahl pulmonaler DCs auf, wobei von Atemwegs-DCs zudem bekannt ist, dass sie von sich aus eine T_{H2} -Polarisierung begünstigen und eine T_{H1} -gewichtete Immunantwort nur nach Erhalt zusätzlicher Signale induzieren¹¹⁸. Auch bewirkt eine Allergen-Provokation in Mausmodellen des experimentellen Asthmas einen extremen Zustrom von mDCs in die Atemwege¹¹⁹. Des Weiteren führt allein der adoptive Transfer von pulmonalen DCs Allergen-behandelter Mäuse in naive Tiere zu einer T_{H2} -dominierten Sensibilisierungsreaktion gegenüber dem verwendeten Allergen¹²⁰, während hingegen die *in vivo* Depletion von CD11⁺-Lungen-DCs während des ersten Allergenkontaktes (in diesem Falle Hausstaubmilbe) die Ausprägung typischer, asthmatischer Merkmale verhindert¹²¹. Zudem sind bestimmte Subgruppen von DCs Vermittler der peripheren Toleranz gegenüber Allergenen. Tatsächlich führt die Entfernung der pulmonalen pDCs dazu, dass auf inhaledierte, grundsätzlich harmlose

Antigene statt mit einer tolerogenen mit einer immunogenen Antwort mit anschließender T_{H2} -vermittelten Immunität reagiert wird¹¹¹. Umgekehrt führt der Transfer von Atemwegs-DCs tolerisierter Mäuse sowohl *ex*-als auch *in vivo* zur Übertragung der Unempfänglichkeit gegenüber dem entsprechendem Antigen¹²². Nicht zuletzt betreffen eine Reihe von Umwelt- und genetisch bedingter Faktoren, die eine Entwicklung atopischer Erkrankungen begünstigen, zu einem großen Teil die Funktion von DCs¹²³.

1.7 Risikofaktoren für die Entstehung atopischer Erkrankungen

Die allergische Sensibilisierung ist ein noch nicht vollständig aufgeklärter, multifaktorieller Prozess. Warum genau einige Individuen gegenüber eigentlich harmlosen Umweltstoffen eine Allergie entwickeln und andere nicht, ist bis heute nicht geklärt. Derzeit wird aber eine Vielzahl von Risikofaktoren diskutiert: Wie anhand von epidemiologischen Zwillings- und Familienstudien gezeigt werden konnte, spielt die genetische Prädisposition bei der Entwicklung von Allergien eine zentrale Rolle¹²⁴. Beispielsweise stellt eine positive atopische Familienanamnese einen bedeutenden Risikofaktor dar; im Vergleich zu Kindern nicht atopischer Eltern weisen Kinder atopischer Eltern ein 3-4-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko für *Asthma bronchiale* auf (Deutscher Asthma und Allergie Bund). Mittlerweile haben eine Vielzahl genomweiter Assoziations- und Kopplungsanalysen eine Reihe von Suszeptibilitätsgenen identifiziert, die sich in vier Gruppen unterteilen lassen. Gene, die assoziiert sind mit: (I) der angeborenen Immunität und der Immunregulation, (II) der T_{H2} -Zelldifferenzierung und deren Funktion, (III) der Epithelbiologie und der mukosalen Immunität, (IV) der Lungenfunktion¹²⁵. Auch wenn genetische Faktoren in Bezug auf die Manifestation von allergischen Erkrankungen einen bedeutenden Risikofaktor darstellen, bieten diese allein keine Erklärung für den stetigen Anstieg der Prävalenz atopischer Erkrankungen in den letzten Jahrzehnten¹²⁶. Denn zum einen kann sich eine genotypische Veränderung in einer Population innerhalb so kurzer Zeit kaum vollziehen, zum anderen deuten regional unterschiedliche Verteilungsmuster der Erkrankungsraten trotz genetisch sehr ähnlicher Populationen (z.B. ehemals Ost- vs. Westdeutschland¹²⁷) darauf hin, dass es noch andere Gründe für die dramatische Zunahme von Überempfindlichkeitsreaktionen geben muss¹²⁸.

1.8 Die Hygienehypothese

Einer der Erklärungsansätze für die steigende Inzidenz atopischer Erkrankungen in den industrialisierten Ländern ist die sogenannte „Hygienehypothese“, welche erstmals 1989 von David P. Strachan formuliert wurde¹²⁹. Durch seine epidemiologischen Studien stellte er eine inverse Korrelation zwischen der Anzahl an Geschwistern und der Reihenfolge der Geburt und dem Auftreten von Heuschnupfen fest. Er postulierte daraufhin, dass eine hohe Infektionsrate im Kleinkindalter, verursacht durch den „unhygienischen“ Kontakt mit älteren Geschwistern oder durch Infektionen der Mutter während der Schwangerschaft, die Entstehung allergischer Erkrankungen im späteren Leben vorbeugen kann.

Diese inverse Korrelation konnte bis heute durch zahlreiche Studien immer wieder belegt werden¹³⁰. Darüber hinaus unterstützt eine Vielzahl von epidemiologischen Studien die Annahme eines protektiven Effekts bakteriellen und parasitären Kontaktes auf die Allergieentwicklung. Beispielsweise ist hier die bereits erwähnte, steigende Inzidenz atopischer Erkrankungen und Asthma in den letzten Jahrzehnten, welche mit einem Rückgang vieler Infektionskrankheiten korreliert¹³¹. Auch die beobachteten, im Vergleich zu Westdeutschland signifikant niedrigeren Prävalenzen von Asthma, Giemen und allergischer Rhinitis in Ostdeutschland lassen sich vor diesem Hintergrund mit dem höheren Lebensstandard Westdeutschlands, der laut Strachan mit einer geringeren Keimbelastung der Umwelt gleichzusetzen ist, sowie den in Ostdeutschland weiter verbreiteten Kindertagesstätten erklären¹³². Im Laufe der Jahre wurde die Hygienehypothese auf verschiedene Bereiche ausgeweitet und besagt nach heutiger Definition, dass nicht nur eine stark verminderte Häufigkeit bakterieller Infektionen im Kleinkindalter, sondern auch eine zu geringe Exposition mit mikrobiellen Komponenten aus der Umwelt zu einer gesteigerten Wahrscheinlichkeit der Allergieentwicklung im späteren Leben führt¹³⁰. Im Rahmen dieser Hypothese ist auch der sogenannte „Bauernhofeffekt“ beschrieben worden. Dieser allergieprotektive Effekt wurde bereits 1989 von schwedischen Medizinern und Immunologen bei Untersuchungen an Zehntausenden von Wehrpflichtigen entdeckt, doch erst 10 Jahre später begann eine ausführlichere Untersuchung der zugrundeliegenden Korrelation. So wurden seit 1999 zahlreiche Studien zur Umweltexposition von Kindern im ländlichen Raum weltweit, vorrangig aber in Europa, durchgeführt^{133,134,135,135,136,137,138}. Sie alle machen deutlich, dass Kinder, die auf Bauernhöfen aufgewachsen sind, seltener an IgE-vermittelten Allergien und Asthma leiden als Altersgenossen ohne bauernhöflichen Kontakt,

wobei sich insbesondere ein regelmäßiger Stallkontakt und der Verzehr von roher Kuhmilch als schützend erwies¹³³. So beobachteten Riedler *et al.* bei ihren Studien, dass auch Nicht-Bauernkinder bei regelmäßiger Kontakt zum Viehbestand ebenfalls niedrigere Sensibilisierungsraten aufwiesen¹³⁹. Zusammen mit dieser Beobachtung und vor dem Hintergrund, dass der allergieprotektive Effekt auf Bauernhöfen ohne Viehzucht nicht nachweisbar ist¹⁴⁰, beziehungsweise dieser auf Höfen mit intensiver, aber dennoch traditioneller, Viehzucht deutlich stärker ist¹³⁶, lässt sich vermuten, dass der präventive Effekt durch Bestandteile aus Tierställen vermittelt wird. In der Tat haben die Untersuchungen von Peters *et al.* gezeigt, dass sich der aus Kuhställen isolierte Staubextrakt in *in vivo* Mausmodellen protektiv gegenüber der Entwicklung von akutem, allergischem Asthma auswirkt¹⁴¹. Tierställe sind neben einer Fülle von pflanzlichen Partikeln aus Gras, Getreide und Mais vor allem reich an einer großen Vielfalt von Bakterien und Pilzen, beziehungsweise deren Bestandteilen, weshalb vermutet wurde, dass das geringere Risiko, an Allergien zu erkranken, möglicherweise auf die hohe mikrobielle Belastung auf Bauernhöfen zurückzuführen ist. Erste Anhaltspunkte hierfür lieferte die *Allergy and Endotoxin Population* (ALEX)-Studie¹⁴², in der u.a. eine inverse Beziehung zwischen der Höhe der gemessenen Endotoxinkonzentrationen in den Schlafstätten von Kindern und der allergischen Sensibilisierung gezeigt werden konnte¹³⁸. Chemisch betrachtet handelt es sich bei Endotoxinen, den Bestandteilen der äußeren Zellwand Gram-negativer Bakterien, um LPS. Dieses wird in Abhängigkeit des Expositionszeitpunktes, der Dosis und der Art der Aufnahme aber auch mit der Entstehung beziehungsweise Exazerbation von Asthma in Verbindung gebracht¹⁴³. Ähnliche Zusammenhänge zwischen der Höhe der Belastungskonzentrationen und niedrigeren Prävalenzen allergischer Erkrankungen konnten mittlerweile auch für andere Substanzen gezeigt werden. Hierzu gehören Muraminsäure^{144,140}, eine Zellwandkomponente aller Bakterien, die aber häufiger in Gram-positiven Spezies vertreten ist, β -1,3-Glucane, Bestandteile der Zellwand der meisten Pilze, die aber auch von einigen Bakterien produziert werden und in vielen Pflanzen zu finden sind, und extrazelluläre Polysaccharide, die von verschiedenen Pilzen abgesondert werden¹⁴⁵. Darüber hinaus konnten auch für CpG-Motive, Komponenten Gram-negativer und –positiver Bakterien¹⁴⁶, sowie für Lipoproteine und Lipoglykane, Bestandteile der mykobakteriellen Zellwand, allergieprotektive Effekte nachgewiesen werden¹⁴⁷.

1.8.1 Identifizierung und Charakterisierung verschiedener allergieprotektiver Kuhstallisolate

Die aufgrund der Ergebnisse von epidemiologischen Studien entstandene Annahme, dass der Kontakt mit bestimmten Mikroben der bauernhöflichen Umgebung eine Allergieprotektion induziert, konnte tierexperimentell und in *in vitro* Versuchen mit humanen Zellen untermauert werden. So übten sowohl der Gram-negative Stamm *Acinetobacter lwoffii* F78 (*A. lwoffii*) als auch die Gram-positive Spezies *Lactococcus lactis* G121 (*L. lactis*) in einem Mausmodell des experimentellen Asthmas nach intranasaler Applikation einen protektiven Effekt bezüglich der Ausbildung eines asthmatischen Phänotyps aus¹⁴⁸. Darüber hinaus zeigte sich, dass diese Stämme nach Zugabe zu humanen moDCs eine Reifung und damit einhergehend ein T_H1-polarisierendes Programm induzieren¹⁴⁸. Beide Spezies wurden im Zuge der ALEX-Studie neben einer Vielzahl weiterer Bakterien aus Kuhställen isoliert und zeichnen sich durch ihr besonders häufiges Vorkommen aus¹³³. Auch für den Gram-positiven Stamm *Staphylococcus sciuri* W620 (*S. sciuri*), welcher sich in den von Ege *et al.* durchgeführten Korrelationen der Asthmaprotektion und dem Aufwachsen auf traditionell geführten Bauernhöfen durch eine starke Signifikanz hervorhob¹⁴⁹, konnte in Mausmodellen eine Fähigkeit zur Allergieprävention nachgewiesen werden¹⁵⁰. In *in vitro* Versuchen im Rahmen der Dissertation¹⁵¹ und Veröffentlichung¹⁵⁰ von Karina Stein zeigte sich, dass die Behandlung von moDCs mit diesem Kuhstallisolat eher zu tolerogenen DCs führt. Die Allergieprotektion könnte in diesem Falle also eher durch mikrobiell-induzierte Toleranz gegenüber aufgenommenen Antigenen vermittelt werden¹⁵¹.

1.8.2 Diversitätseffekt

Aufgrund der Studien von Braun-Fahrländer *et al.*, in denen sie im Serum von Kindern von Vollzeit-Bauern niedrigere IgE-Spiegel nachwiesen als in dem von Eltern, die diesem Beruf nur halbtags nachgehen¹⁵², lässt sich eine dosisabhängige Beziehung zwischen den mikrobiellen Expositionen und der atopischen Sensibilisierung vermuten. Eindeutige Ergebnisse hierzu stehen aber noch aus und bis heute ist nicht geklärt, ob die Quantität, die Qualität oder die Frequenz und Dauer des Kontaktes mit den mikrobiellen Bestandteilen der bauernhöflichen Umgebung den entscheidenden Faktor bei der Allergieprävention darstellen.

Zwei jüngere epidemiologische Untersuchungen aus Bayern (*prevention of allergy, risk factors for sensitization related to farming and anthroposophic lifestyle, PARSIFAL*)¹⁵³ und Europa (*multidisciplinary study to identify the genetic and environmental causes of asthma in the european community advanced study, GABRIELA*)¹⁵⁴ haben aber deutlich gemacht, dass nicht eine einzelne Substanz, sondern die Exposition gegenüber einer Breite von zahlreichen Mikroorganismen die Reduktion von Atopie und Asthma in der bäuerlichen Umwelt bedingen¹⁵⁵. So zeigen die Berechnungen von Ege *et al*, die im Rahmen der PARSIFAL und GABRIEL-Studien angestellt wurden, dass Kinder in einem bäuerlichen Umfeld einer höheren mikrobiellen Diversität ausgesetzt sind als Kinder aus Vergleichsgruppen. Dabei zeigte sich eine negative Korrelation zwischen der mikrobiellen Bandbreite der Exposition und der Wahrscheinlichkeit dafür, später Asthma zu entwickeln („Diversitätseffekt“)¹⁵⁵. Diese Beobachtung wird durch einen weiteren Befund, der ebenfalls im Zuge der PARSIFAL-Studie gemacht wurde, untermauert. So zeigte sich eine Dosis-Wirkungsrelation für die Regulation von *tlr4*, *tlr2* und *cd14*, Gene, die in Bauernkinder im Vergleich zu Nicht-Bauernkindern signifikant verstärkt exprimiert werden und ebenfalls mit einer Allergieprotektion in Verbindung gebracht werden¹⁵⁶. Diese Hochregulation wird durch den pränatalen Kontakt der Mutter mit Hoftieren induziert und steigt mit zunehmender Zahl der verschiedenen Spezies, zu denen die Mutter während der Schwangerschaft Kontakt hatte¹⁵³.

1.8.3 Potentielle zelluläre Mechanismen der Hygienehypothese

Die zellulären und molekularen Mechanismen, die dem protektiven Effekt des Bauernhoflebens zu Grunde liegen könnten, sind insbesondere in Hinblick auf die Entwicklung allergiepräventiver Anwendungen von herausragendem Interesse und deshalb Gegenstand derzeitiger Forschungen und Diskussionen. Da Allergien auf einer dominierenden T_H2-Immunantwort basieren, werden Mechanismen in Betracht gezogen, die die Entwicklung von T_H2-Zellen verhindern. Unter der Annahme, dass eine verringerte, mikrobielle Stimulation der TLRs von Zellen des angeborenen Immunsystems in den ersten Lebensmonaten zu einer verstärkten T_H2-Antwort gegenüber Allergenen führt, werden mit Bezug auf T-Lymphozyten aktuell zwei Entstehungsmodelle diskutiert; zum einen das Modell der „fehlenden Immunpolarisierung“, zum anderen das der „fehlenden Immunsuppression“¹⁵⁷. Die kritische Periode für die Ausbildung einer gesunden T_H1/T_H2-Balance eines Individuums stellen die pränatale und frühe postnatale Phase dar¹⁵⁸, denn bei

Neugeborenen dominieren physiologischerweise T_{H2} -basierte Immunantworten. Erst durch den Kontakt mit Mikroorganismen, welche über TLRs vorrangig T_{H1} -Zellen induzieren, kommt es zu einer Ausbalancierung des T_{H1}/T_{H2} -Verhältnisses⁴.

Nach der zuerst entstandenen Theorie der „fehlenden Immunpolarisierung“ bleibt diese Verschiebung von T_{H2} - zu T_{H1} -Zellen aufgrund einer relativ „sterilen“ Umwelt aus und fördert somit die Entwicklung atopischer Erkrankungen¹⁵⁹. Obwohl eine Reihe von *in vitro* und *in vivo* generierter Daten die Rolle der fehlenden Immunpolarisierung untermauern¹⁶⁰, wird diese Ansicht stark debattiert, insbesondere, da sie mit einer Vielzahl weiterer Befunde schwer in Einklang zu bringen ist. So hat beispielsweise nicht nur die Inzidenz T_{H2} -vermittelter Erkrankungen, sondern auch die der T_{H1} -assoziierten Autoimmunerkrankungen in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen¹³¹. Zudem zeigt sich in Gebieten, die durch diffus verbreitete und chronische T_{H2} -vermittelte Helminthen-Infektionen charakterisiert sind, eine niedrige Prävalenz allergischer Erkrankungen¹⁶¹. Gleichzeitig vermögen eben genau diese Infektionen, obwohl T_{H2} -induzierend, ebenfalls die Entwicklung einer Atopie zu verhindern¹⁶². Darüber hinaus gibt es noch eine Vielzahl weiterer Feststellungen, die der Hypothese einer fehlenden Verschiebung von T_{H2} - zu T_{H1} -Zellen widersprechen^{163,164}. Im Zusammenhang mit Helminthen-Infektionen, die neben einer T_{H2} -Antwort auch eine starke Produktion supprimierender Zytokine induzieren können, entstand neben dem Modell der unzureichenden T_{H1} -Induktion eine alternative Ansicht zur Erklärung der Hygienehypothese, welche den T_{reg} eine bedeutende Rolle zuschreibt. Da diese durch Sezernierung suppressiver Zytokine eine hemmende Wirkung sowohl auf T_{H1} - als auch auf T_{H2} -Zellen haben, könnte auch eine unzureichende Entwicklung dieser Zellpopulation, vor allem in der frühen Kindheit, ein Grund für die Entwicklung von allergischen Erkrankungen sein¹⁵⁷. Auch diese These wird durch eine Reihe von Befunden unterstützt. Beispielsweise wurde im Rahmen der Studien von von Mutius *et al.* festgestellt, dass sich im Nabelschnurblut von Bauernkindern, die wie zuvor erwähnt einen gewissen Allergieschutz besitzen, nicht nur eine erhöhte Anzahl von $FoxP3^+$ - T_{reg} -Zellen nachweisen lässt, sondern, dass diese auch eine deutlich höhere supprimierende Effizienz besitzen¹⁶⁵. Da sich die Hygienehypothese auf zellulärer Ebene also sowohl durch eine unzureichende Immunpolarisierung, als auch durch eine zu geringe Immunsuppression erklären lässt, geht man aktuell von der Gültigkeit beider Hypothesen, eventuell auch in gegenseitiger Ergänzung, aus¹⁶⁶.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Für *L. lactis*, *A. Iwoffii* und *S. sciuri*, drei der Kuhstallisolaten, die im Zuge der verschiedenen Studien zur Untersuchung des allergiepräventiven Effektes der Bauernhofumgebung identifiziert wurden, konnten bereits allergieprotektive Eigenschaften in verschiedenen Mausmodellen nachgewiesen werden (siehe 1.8.1). In unserer Arbeitsgruppe wurden die zugrunde liegenden Mechanismen in Bezug auf humane DCs und die Polarisierung von T_H-Zellen *in vitro* größtenteils aufgeklärt^{148,150,167,168}. Die Studien von Ege *et al.* zeigen eindrucksvoll, dass sich eine hohe mikrobielle Diversität positiv auf die Stärke der Mikrobenvermittelten Allergieprävention bei Kindern, die auf traditionell geführten Bauernhöfen aufwuchsen, auswirkt¹⁵⁵. Vor diesem Hintergrund liegt es nahe, experimentell möglichst viele und unterschiedliche Komponenten, die mit einer Allergieprotektion assoziiert sind, zu untersuchen. Insbesondere deren Zusammenspiel in Bezug auf die Induktion eines Allergieschutzes ist für ein besseres Verständnis des Diversitätseffektes von herausragendem Interesse. Aus diesem Grunde sollten im Rahmen dieser Arbeit zunächst zwei weitere Bakterienisolaten hinsichtlich ihrer grundlegenden, immunmodulierenden Fähigkeiten charakterisiert werden und zwar vorrangig in Hinblick auf ihre allergieprotektiven Eigenschaften. Anlehnend an die Ergebnisse von Hagner *et al.*¹⁵⁰ und Debarry *et al.*¹⁴⁸ sollte dabei die Wirkung dieser beiden Isolate auf moDCs und die resultierende Polarisationsrichtung naiver T-Zellen im Vordergrund stehen. Namentlich handelt es sich bei diesen beiden Gram-positiven Spezies um *Jeotgalicoccus psychrophilus* (*J. psychrophilus*) und *Lactobacillus curvatus* W713 (*Lb. curvatus*), welche beide von Ege *et al.* identifiziert wurden und ebenfalls invers mit dem Auftreten von allergischen Erkrankungen korrelieren¹⁴⁹. Um den positiven Effekt der mikrobiellen Vielfalt auf zellulärer Ebene nachvollziehen zu können, sollte im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob sich veränderte Effekte auf die Immunantwort durch Kombination der fünf verschiedenen allergieprotektiven Bakterien im Vergleich zu den jeweiligen Einzelstimulationen zeigen. Auch in diesem Abschnitt sollten moDCs als Modellsystem verwendet werden und der Fokus auf die induzierte Polarisationsrichtung des adaptiven Immunsystems gerichtet sein.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

AutoMACS™	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Binokular und Durchlichtmikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
DeNovix Ds-11+ Spectrophotometer	HVD Life Science GmbH, Wien, Österreich
Eppendorf BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Thermomixer C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
JE-B6-Elutriator	Beckmann, München, Deutschland
LightCycler®480 II	Roche GmbH, Mannheim, Deutschland
LSR II Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Mehrkanalpipette	Biohit, Helsinki, Finnland
Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrotiterplatten-Photometer (Sunrise Reader®)	Tecan, Männedorf, Schweiz
Multistepper 50/100/150/200	Finnpipette Labsystems
Plattenschüttler	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Rotanta 46RC	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Rotixa 50 RS	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Sysmex Platelet Counter PL-100	Sysmex, Hamburg, Deutschland
Ultrawash Plus	Dynex Technologies, Berlin, Deutschland
Wasserbad	Julabo, Seelbach, Deutschland
Zellzählgerät (Countess®)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

2.2 Verbrauchsmaterialien

6-Loch-Zellkulturplatten	Dow Corning Corporation Midland, USA
96-Loch ELISA Mikroplatte	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
ELISA-Platte, High-Bind., F	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Gewebekulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Glaspasteurpipette	Brand GmbH & CO KG, Wertheim, Deutschland
Light Cycler 480 Multiwell Plate 96	Roche GmbH, Mannheim, Deutschland
Reaktionsrörchen 15, 50 ml	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Serologische Pipetten, 2, 5, 10, 25 ml	Vitaris AG, Baar, Deutschland
Sterilfilter 0,2 µm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellzählkammer	Invitrogen, Carlsbad, USA
Zentrifugenrörchen 12, 15, 50 ml	Corning Incorporated, New York, USA

2.3 Chemikalien

1,4-Dithio-DL-Threitol (DTT)	Biochemika Fluka, Buchs, Schweiz
<i>Aqua ad injectabilia</i>	Braun, Melsungen, Deutschland
Aceton	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Bovine serum albumin</i> (BSA)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Bromphenolblau	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
<i>Fetal calf serum</i> (FCS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Gentamicin	Invitrogen, Carlsbad, USA
Glyzerin	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Biochemika Fluka, Buchs, Schweiz
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt Deutschland
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>Morpholinopropene sulfonic acid</i> (MOPS)	Sigma-Aldrich, Crailsheim, Deutschland

Material und Methoden

Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, Crailsheim, Deutschland
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Biochemika Fluka, Buchs, Schweiz
Penicillin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Streptomycin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Tetramethylbenzidin (TMB)	Biochemika Fluka, Buchs, Schweiz
Trinatriumcitrat-Dihydrat (C ₆ H ₉ Na ₃ O ₉)	Merck, Darmstadt Deutschland
Trypanblau-Lösung	GIBCO GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin EDTA	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Trypticase Soy Broth (TSB)	Difco, Lawrence, USA
Trypton	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Tween20	Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland

2.4 Puffer und Medien

Azid-PBS	0,1 % (w/v) NaN ₃ in PBS
DMEM	Dulbecco`s MEM Flüssigmedium mit NaHCO ₃ , w/o L-Glutamin, w/o L-Glutamin, w/o Natrium-Pyruvat, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
DMEM _{komplett}	DMEM Flüssigmedium +100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 % FCS
FCS	inaktiviert für 30 min bei 56°C, sterilfiltriert
Ficoll-Paque	LSM 1077 Separations Medium, PAA Laboratories, Pasching, Österreich
HBSS	1 x HBSS w/o NaHCO ₃ (PanBiotech, Aidenbach, Deutschland), 5 mM NaHCO ₃ pH 7,2
MACS Puffer	1x PBS, 0,5 % BSA, 2mM EDTA
PFA (3 %)	3 % para-Formaldehyd in PBS
Phosphatgepufferete Salzslösung (PBS, 10x)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Material und Methoden

RPMI	VLE RPMI 1640 mit NaHCO ₃ , mit L-Glutamin, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
RPMI _{DC}	RPMI 1640 mit L-Glutamin +100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 % FCS, 750 U/ml IL-4, 500 U/ml GM-CSF
RPMI _{komplett}	RPMI + 100 µg/ml Streptomycin, 10 % FCS
SB-Medium für <i>A. Iwoffii</i>	10 g MOPS, 20 g Hefeextrakt, 30 g Trypton in 1 l H ₂ O, Zugabe von 10 ml 2 M Glucose nach Autoklavieren, pH 7
TSB ⁺ -Medium für <i>L. lactis</i> und <i>S. sciuri</i>	TSB Medium mit 0,3 % Hefeextrakt, pH 6,8-7,2

2.5 Stimulantien und Zusätze

LPS	isoliert aus <i>Salmonella enterica sv. Friedenau</i> , zur Verfügung gestellt von Helmut Brade, FZB
huGM-CSF	rekombinant, InvivoGen, San Diego, USA
IL-4	rekombinant, InvivoGen, San Diego, USA
PMA	CalBiochem, Darmstadt, Deutschland
Ionomycin	Invitrogen, Carlsbad, USA
P ₃ CSK ₄	EMC microcollections GmbH, Tübingen, Deutschland

2.6 Antikörper

Tab.2: Verwendete Antikörper mit Angaben zu Isotyp, Fluorochrom, eingesetzter Verdünnung und Bezugsquelle

Antikörper (Maus)	Isotyp (Maus)	Fluoro- chrom	Verdünnung [auf 100 µl]	Bezugsquelle
FACS Antikörper				
IgG1	-	PE		
IgG2a	-	PE		
Anti-human CD80	IgG1	PE		
Anti-human CD86	IgG1	PE	3 µl	BD, Heidelberg
Anti-human CD209	IgG1	PE		Deutschland
Anti-human CD1a	IgG1	PE		
Anti-human CD14	IgG2a	PE		
Anti-human CD4	IgG1	PE	3 µl	Immunotools, Friesoythe;
Anti-human CD45RA	IgG2b	FITC	5 µl	Deutschland
IgG2b	-	FITC	5 µl	

2.7 Kultivierung und Aufbereitung der Bakterien

Die aus Kuhställen isolierten Bakterien *L. lactis*, *A. Iwoffii*, *S. sciuri*, *Lb. curvatus* und *J. psychrophilus* wurden von Otto Holst (FZB, Strukturbiochemie) zur Verfügung gestellt.

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich abgetötete Bakterienpräparationen verwendet, die nach folgendem Ablauf hergestellt wurden.

- Vorkultur ü.N.
- Hauptkultur bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase
- Zentrifugation (10 min, 4400 g, RT)
- Abtötung durch Inkubation in Antibiotika-haltigem Medium
- Zentrifugation und Aufnahme in PBS, Lagerung bei 4°C

Die Spezifikationen dieses Ablaufes für die einzelnen Bakterien sind nachstehender Tabelle zu entnehmen (Tab.3).

Tab.3: Spezifische Bedingungen für die Herstellung abgetöteter Kuhstallpräparate

	<i>L. lactis</i>	<i>A. Iwoffii</i>	<i>S. sciuri</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>J. psychro.</i>
Medium	TSB ⁺	SB	TSB	MRS	MB
Vorkultur	37°C	30°C	30°C	30°C	30°C
Hauptkultur	37°C	30°C	30°C	30°C	30°C
Erreichen der log-Phase nach	4-6h	4-6h	4-6h	4-6h	6-10h
Abtötung	P/S- Lösung 37°C 30 min	P/S- Lösung 37°C 30 min	PBS+1mg/ml Gentamycin RT 1h	P/S- Lösung 37°C 30 min	P/S- Lösung 37°C 30 min

Die präparierten Bakterien wurden maximal 4-6 Wochen für Versuche verwendet und dann neu hergestellt. Die Aktivität aller neuen Bakterien wurde stets durch Stimulation transient transfizierter HEK293-Zellen (NOD1, NOD2, TLR2 und TLR4) und anschließender Bestimmung der CXCL8-Konzentration im Überstand überprüft (siehe 2.8.1, S.33). So konnten die Präparate auch auf vermeintliche Kontaminationen überprüft werden. Die Konzentrationseinstellung der abgetöteten Bakterien auf 10⁹ KBE/ml erfolgte durch Messung der optischen Dichte OD₆₀₀. Hierfür wurden im Vorfeld von allen fünf Bakterienspezies im lebenden Zustand Verdünnungsreihen (auf TSB⁺-Agarplatten) ausgezählt und mit der optischen Dichte korreliert.

2.8 Zellkultur

2.8.1 Kultur, Transfektion und Stimulation von HEK293-Zellen

Die humane Zelllinie HEK293 (*human embryonic kidney cells*) wurde bei 37°C und 5 % CO₂ in 75 cm² Kulturflaschen in DMEM gehalten. Bei einer Konfluenz von etwa 80 % wurden die Zellen passagiert und gegebenenfalls für Versuche ausgesät. Zur Durchführung transienter Transfektionen wurden 100 µl Zellsuspension (2,5x10⁵ Zellen/ml) in 96-Loch-Platten ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit 0,2 µl/Ansatz Lipofectamin und den in Tab.4 aufgeführten Plasmiden transfiziert. Weitere 24 h später fand nach einem Mediumswechsel die Stimulation der Zellen statt. Nach 18-stündiger Stimulation wurden die Überstände gewonnen und mittels ELISA analysiert.

Tab.4: Für die transiente Transfektion von HEK293-Zellen verwendete Plasmide

Plasmid	Bezugsquelle	Transfizierte Mengen
NOD1	Dr. P. Nelson, Seattle, USA	100 ng
NOD2	Dr. P. Rosenstiel, Kiel, Deutschland	100 ng
TLR2	Dr. P. Nelson, Seattle, USA	100 ng
TLR4	Dr. P. Nelson, Seattle, USA	100 ng

2.8.2 Gewinnung humaner mononukleärer Zellen (MNCs) mittels Dichtegradientenzentrifugation

Für die Gewinnung humaner MNCS wurde frisches Vollblut gesunder, erwachsener Spender zunächst mit Heparin versetzt (2000 i.E. /100 ml Blut) und mit PBS verdünnt (1:2). Dieses Gemisch wurde in 50 ml Reaktionsgefäß auf 15 ml Ficoll-Paque geschichtet und anschließend mittels der Dichtegradientenzentrifugation nach Böyum¹⁶⁹ aufgetrennt (35 min, 2000 rpm, RT, Abstoppen ohne Bremse). Hierbei sammeln sich die MNCs in der Interphase und konnten nach Absaugen des Plasmaüberstandes aufgenommen werden. Nach drei Waschschritten (10 min, 2000 rpm, 4°C) mit kaltem PBS wurden die MNCs in HBSS aufgenommen und die Zellzahl ermittelt (siehe 2.8.7, S.35).

2.8.3 Isolierung humaner Monozyten und Lymphozyten mittels Elutriation

Nach dem Prinzip der Gegenstromzentrifugation können Zellen verschiedener Größen mittels Elutriation getrennt werden⁵⁶. Nach dem Einstellen der gewonnenen MNCs (siehe

Material und Methoden

2.8.2, S.33) auf maximal 5×10^6 Zellen/ml wurden die Zellen bei einer Fließgeschwindigkeit von 32 ml/min und einer Rotorgeschwindigkeit von 1720 g in die Trennkammer des Elutriators eingeladen. Durch schrittweise Erhöhung der Durchflussgeschwindigkeit bei konstanter Rotorgeschwindigkeit werden zunächst kleinere Zellen -Erythrozyten und Lymphozyten- ausgespült und gegebenenfalls aufgefangen, die größeren Monozyten hingegen verlassen die Trennkammer erst bei hoher Durchflussgeschwindigkeit (maximal 64 ml/min) und wurden separat gesammelt. Die Reinheit der isolierten Monozyten wurde anhand der Oberflächenmarker CD209, CD14 und CD1a mit Hilfe einer FACS-Analyse (siehe 2.10, S.36) überprüft. Während Monozyten CD14-positiv sind, lassen sich weder CD209 noch CD1a auf ihrer Oberfläche nachweisen. Die Reinheit der gewonnenen Monozyten wurde in unregelmäßigen Abständen überprüft und lag in der Regel zwischen 85 und 98 %. Die gesammelten Lymphozyten wurden mit einer Konzentration von maximal 150 Mio. Zellen/15ml bis zur Verwendung in RPMI_{komplett} bei 37°C und 5 % CO₂ in 75cm² Kulturflaschen gehalten.

2.8.4 Generierung humaner von DCs aus Monozyten

Die isolierten Monozyten wurden nach der von Sallusto und Lanzavecchia etablierten Methode⁵⁶ zu DCs differenziert. Zu diesem Zwecke wurden die gewonnenen Monozyten zu je 5 ml/Loch (1×10^6 Zellen/ml in RPMI_{DC}) in einer 6-Loch-Platte ausgesät und bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Alle 2-3 Tage fand ein halber Mediumswechsel statt. Nach 7 Tagen wurden die Zellen geerntet und entsprechend der Versuche ausgesät (siehe Tab.5, S.35). Der Differenzierungsstatus der DCs wurde in regelmäßigen Abständen mittels FACS-Messungen (CD14⁻, CD1a⁺, CD209⁺, siehe 2.10, S.36) ermittelt und lag bei 85-95 %.

2.8.5 Stimulation humaner DCs

Die differenzierten DCs (siehe 2.8.4, S.34) wurden in frischem RPMI_{komplett} auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und in Abhängigkeit der durchzuführenden Analysen ausgesät (siehe Tab.5, S.35). Nach einer Setzzeit von mind. 4 h (37°C, 5 % CO₂) wurden die in RPMI_{komplett} verdünnten Stimuli im Verhältnis 1:10 zu den Zellen gegeben. Die weitere Behandlung der Zellen nach Beendigung der Stimulationsdauer ist nachstehender Tabelle (Tab.5) zu entnehmen.

Material und Methoden

Tab.5: Aussaat und Behandlung humaner DCs in Abhängigkeit der gewählten Untersuchungsmethode

Untersuchungsmethode	Ausgesäte Menge pro Loch [µl]	Behandlung nach Stimulation
ELISA	100	Gewinnung der Überstände
FACS	500-1000	Pelletierung
RNA-Isolation	1000-2000	Pelletierung und Aufnahme in 350 µl Lysepuffer
Kokultur-Versuche	500-1000	Sammeln, waschen und Zellzahleinstellung in frischem RPMI _{komplett} , anschließende Kokultivierung mit TCs

2.8.6 Kokultur humaner DCs mit autologen, naiven CD4⁺ T-Zellen

Für das Ansetzen von Kokulturen humaner DCs mit naiven CD4⁺ T-Zellen mussten zunächst direkt vor Versuchsbeginn die naiven CD4⁺ TCs aus den autologen Lymphozyten gewonnen werden. Hierfür wurde das *Naive CD4⁺ T Cell Isolation Kit II* (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland) verwendet. Nach Angaben des Herstellers wurden die Lymphozyten erst magnetisch markiert und anschließend mittels Negativselektion am AutoMACS® aus dem Lymphozytengemisch isoliert. Nach Aufnahme in frischem RPMI_{komplett} und Zellzahleinstellung wurden die CD4⁺ TCs je nach Versuchsansatz in 96-Loch-Platten (für ELISA, 100 µl/Loch, 1x10⁶ Zellen/ml) oder 12-Loch-Platten (für RNA-Isolation, 1000 µl/Loch, 2-3x10⁶ Zellen/ml) vorgelegt. Anschließend wurden die bereits für 20h stimulierten (oder unstimulierten) DCs (siehe 2.8.5, S.34) im Verhältnis 1:10 (DC:TC) hinzugefügt und diese Kultur für fünf Tage bei 37°C und 5 % CO₂ gehalten. An Tag 6 der Kokultur wurden die Zellen entweder für 5 h mit 50ng/ml 12-myristate-13-acetat (PMA) und 2 µg/ml Ionomycin restimuliert und die Überstände für ELISA gewonnen (siehe 2.9, S.36), oder die Zellen in 350 µl Lysepuffer resuspendiert und die RNA gewonnen (siehe 2.11, S.37).

2.8.7 Bestimmung der Zellzahl

Sowohl die Zellzahl als auch deren Vitalität wurden mit dem Zellzählgerät Countess® bestimmt. Hierzu wurden 10 µl der 1:2 mit 0,1 % (w/v) Trypanblaulösung verdünnten Zellen in eine Zellzählkammer überführt und von dem Gerät ausgezählt.

2.9 *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*

Die Konzentrationsbestimmung verschiedener Zytokine in Zellüberständen fand unter Zuhilfenahme der in Tab.6 aufgelisteten ELISA-Kits statt. Die Durchführung erfolgte stets nach Herstellerangaben, die Absorption der entwickelten ELISA-Platten bei 550 nm wurde mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Photometer gemessen und mit der Magellan 2 Software ausgewertet.

Tab.6: Verwendete ELISA-Kits und deren Bezugsquelle

ELISA	Bezugsquelle
CXCL8	
IFN- γ	
IL-1 β	Thermo Fisher, Waltham, USA
IL-4	
IL-6	
IL-10	
IL-12p70	
TNF- α	
IL-23	R&D Systems, Minneapolis, USA
IL-12-p70	Affymetrix, Santa Clara, USA

2.10 Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting, FACS*)

Pro Antikörper wurden je 200.000 der zu charakterisierenden Zellen durch Zentrifugation pelletiert (4°C, 2000 rpm, 10 min), mit kaltem PBS gewaschen (4°C, 2000 rpm, 10 min) und in 100 μ l Azid-PBS resuspendiert. Nach entsprechender Antikörperzugabe (siehe 2.6, S.31) folgte eine 20-minütige Inkubationszeit (lichtgeschützt, 4°C). Anschließend wurden die Zellen mit Azid-PBS gewaschen, das erhaltene Pellet in 200 μ l Azid-PBS aufgenommen und gründlich resuspendiert. Nach Fixierung der Zellen durch Zugabe von 200 μ l 3 % PFA konnten die Proben mehrere Tage gelagert werden (lichtgeschützt, 4°C). Die Messung der Proben erfolgte am FACS LSR II und wurde mit der Software FlowJo V. 7.6.1 (Tree Star, Ashland, USA) ausgewertet.

2.11 Molekularbiologische Methoden

2.11.1 Isolierung der Gesamt-Ribonukleinsäure (RNA) und Reverse Transkription (RT)

Die Gesamt-Ribonukleinsäure (RNA) aus TCs und DCs erfolgte unter Verwendung des *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben. Für das Umschreiben festgelegter Mengen RNA in komplementäre DNA (cDNA) mit der Reversen Transkriptase *Superscript III*® (Merck, Darmstadt, Deutschland, nach Angaben des Herstellers) wurde zuvor die Konzentration und Reinheit der gewonnenen RNA mit dem *DeNovix Ds-11+ Spectrophotometer* bestimmt.

2.11.2 Quantitative Real-time Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)

Um die relative Genexpression in Proben zu bestimmen wurden RT-qPCRs am LightCycler® 480 II (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green (SYBR Green, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Sequenzen der verwendeten *sense* (s) und *anti-sense* (as) Oligonukleotide sind nachstehender Tabelle (Tab.7) zu entnehmen. Mit Ausnahme von IFN-β und GAPDH sind alle Oligonukleotid-Paare intronumspannend. Die für alle Oligonukleotide verwendete Programmierung des LightCycler®480 II ist in Tab.8 zusammengefasst.

Tab.7:Sequenzen der für die RT-qPCR verwendeten Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz
B2M, s	GCTGTGCTCGCGCTACTCTC
B2M, as	GCAGGCATCTTCAAACCTCCAT
DLL4, s	GGACCACCTCGGCCACTATGT
DLL4,as	CAGCCCGAAAGACAGATAGG
FoxP3, s	GACCAAGGCTTCATCTGTGG
FoxP3, as	CAGCAAACAGGCTGTCAGG
GAPDH, s	GTCATCATCTCCGCCCTCTGC
GAPDH, as	GATGCCTGCTTCACCACCTTCTG
GATA3, s	TCAGACCACCACAACCACAC
GATA3, as	TCTTCATAGTCAGGGTCTGTTAAT
HPRT, s	GTCAGGCAGTATAATCCAAAGA

Material und Methoden

HPRT, as	GGGCATATCCTACAACAAACT
ICAM-1, s	CCTTCCTCACCGTGTACTGG
ICAM-1, as	AGCGTAGGGTAAGGTTCTTGC
IFN- β , s	AAGCAGCAATTTCAGTGTAG
IFN- β , as	CCTCAGGGATGTCAAAGTTCA
IL-2, s	AAGTTTACATGCCAAGAAGG
IL-2, as	AAGTGAAAGTTTGCTTGAGC
IL-5, s	CGAACTCTGCTGATAGCCAAT
IL-5, as	GTACCCCCTTGCACAGTTG
IL-13, s	AGCCCTCAGGGAGCTCAT
IL-13, as	CTCCATACCATGCTGCCATT
IL-18, s	CGCTTCCTCTCGCAACAAACT
IL-18, as	CCGGGGTGCATTATCTCTACA
IL-23p19, s	CAGTGTGGAGATGGCTGTGA
IL-23p19, as	CCGATCCTAGCAGCTTCTCA
Jagged-1, s	CTGGCGGCTGGGAAGGA
Jagged-1, as	GAGGGCTGCAGTCATTGGTAT
OX40L, s	TTGCTGGTGGCCTCTGAAT
OX40L, as	TTGAATTGAGGATACCGATG
PGK1, s	CAGCTGCTGGGTCTGTCAT
PGK1, as	GCTGGCTCGGCTTTAAC
RPL27, s	ATCGCCAAGAGATCAAAGATAA
RPL27, as	TCTGAAGACATCCTTATTGACG
RPL30, s	ACAGCATGCGGAAAATACTAC
RPL30, as	AAAGGAAAATTTGCAGGTTT
SDHA, s	TGGGAACAAGAGGGCATCTG
SDHA, as	CCACCACTGCATCAAATTGATG
T-bet, s	GACTCCCCAACACAGGAG
T-bet, as	GGGACTGGAGCACAATCATC
TGF- β , s	CAGAAATACAGCAACAATTCTGG
TGF- β , as	TTGCAGTGTGTTATCCCTGCTGTC

Material und Methoden

Tab.8: Programmierung des LightCycler® zur Durchführung von RT-qPCRs

Programm	Dauer	Temperatur
Denaturierung	10 min	95 °C
Anlagerung der Oligonukleotide	45 Zyklen a 4-7 s	95 °C -0,5°C/Zyklus
Schmelzkurve	5 min	65-95°C, Erhöhung um 0,1°C/s

3 Ergebnisse

3.1 Grundlegende immunmodulatorische Eigenschaften der Gram-positiven Bakterien *Jeotgalicoccus psychrophilus* W713 und *Lactobacillus curvatus*

Neben den bereits in Grundzügen charakterisierten Kuhstallisolaten *Lactococcus lactis* G121, *Staphylococcus sciuri* W620 und *Acinetobacter lwoffii* F78, zeigt sich auch bei den Spezies *Jeotgalicoccus psychrophilus* W713 und *Lactobacillus curvatus* eine inverse Korrelation mit dem Auftreten von Asthma und Allergien¹⁷⁰. Diese beiden Isolate wurden zunächst auf ihr grundlegendes Potential hin untersucht, humane DCs zu aktivieren. Der Fokus lag hierbei auf Untersuchungen, die Aufschluss über T-Zell-polarisierende Kapazitäten geben können.

3.1.1 Beteiligung verschiedener PRRs an der Zellaktivierung durch *Jeotgalicoccus psychrophilus* W713 und *Lactobacillus curvatus*

Voraussetzung für die Aktivierung von Immunzellen durch Mikroben ist die Induktion vielfältiger Signalwege unter Beteiligung verschiedener PRRs. Um die an der Erkennung von *J. psychrophilus* und *Lb. curvatus* beteiligten Rezeptoren identifizieren zu können, wurde sich des *in vitro* Systems der transienten Transfektion bedient. Hierzu wurden HEK293-Zellen transient mit Plasmiden, die Codierungen für verschiedene PRRs tragen, transfiziert und mit den in Abb.2 angegebenen Stimulanten behandelt. Als Maßstab für die Aktivierung der Zellen wurde der CXCL8-Gehalt im Zellüberstand nach 18-stündiger Stimulation mittels ELISA bestimmt.

Ergebnisse

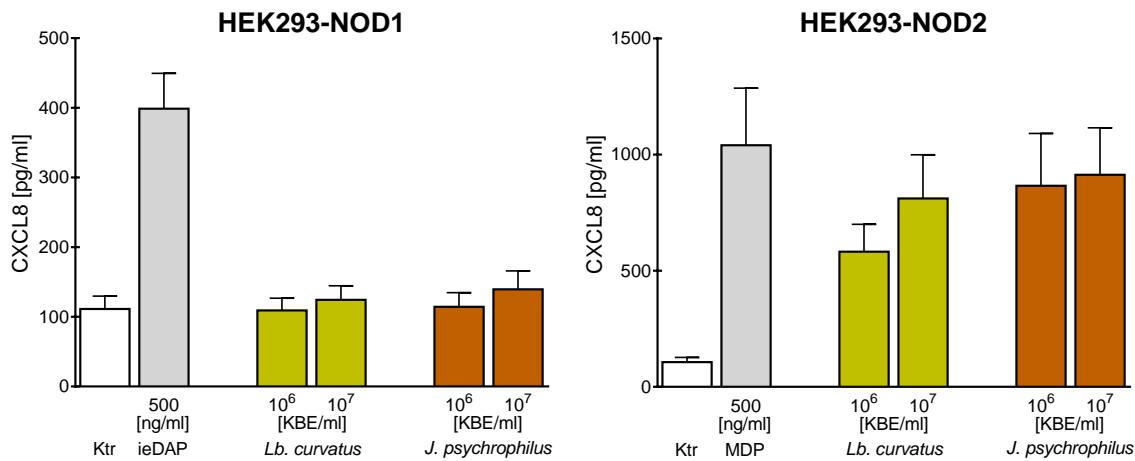


Abb.2: CXCL8-Freisetzung NOD1- und NOD2-transfzierter HEK293-Zellen nach Stimulation mit *J. psychrophilus* und *Lb. curvatus*

HEK293-Zellen wurden transient mit NOD1- oder NOD2-Plasmiden transfiziert, für 18 h mit den angegebenen Stimulantien oder Medium (Ktr) inkubiert und die Konzentration von CXCL8 in den Überständen mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler von n = 14.

In NOD1-transfizierten HEK-Zellen (Abb.2, links) führt weder die Stimulation mit *Lb. curvatus* noch die mit *J. psychrophilus* zu einer CXCL8-Freisetzung, die über die durch reine Mediumbehandlung (Ktr) induzierte hinausgeht. Dass die Transfektionen erfolgreich waren und die verwendeten HEK-Zellen grundsätzlich in der Lage sind, CXCL8 freizusetzen, zeigen die ELISA-Messdaten der mit 500 ng/ml des NOD1-Liganden ieDAP behandelten Zellen, die im Mittel etwa 400 pg/ml CXCL8 freisetzen.

Die NOD2-transfizierten Zellen hingegen lassen sich sowohl durch Behandlung mit *Lb. curvatus* als auch mit *J. psychrophilus* aktivieren (Abb.2, rechts). Dabei ist die Aktivierung der Zellen- bemessen an der CXCL8-Freisetzung- durch 18-stündige Behandlung mit *J. psychrophilus* ungleich geringer wie die durch MDP erreichte, unabhängig davon, ob 10^6 oder 10^7 KBE/ml eingesetzt wurden. Auch *Lb. curvatus* zeigt eine NOD2-Aktivität, die sich in einer konzentrationsabhängigen CXCL8-Freisetzung zeigt. Durch Stimulation der NOD2-transfizierten Zellen mit 10^7 KBE/ml *Lb. curvatus* wird eine Chemokinfreisetzung induziert, die geringfügig unter der von MDP- oder *J. psychrophilus*-stimulierter Zellen liegt.

Ergebnisse

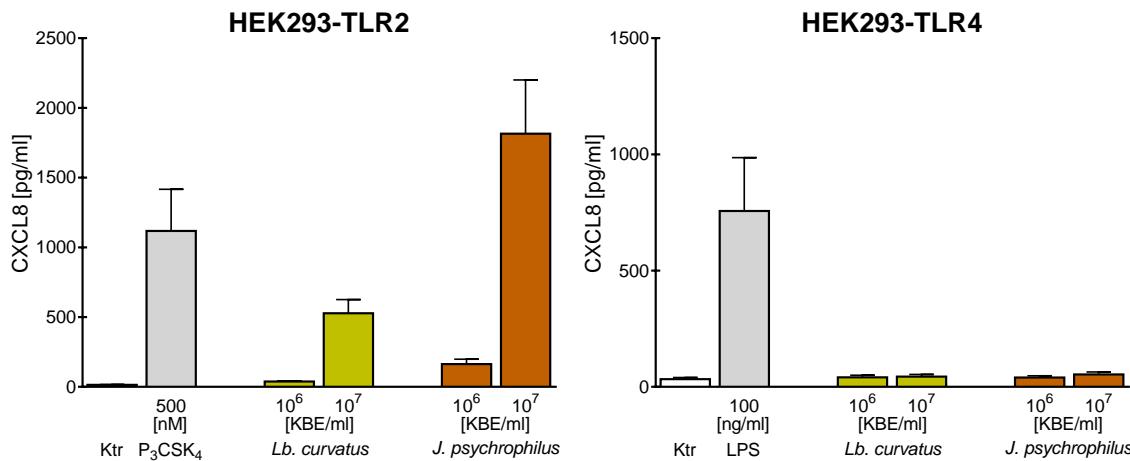


Abb.3: CXCL8-Freisetzung TLR2- und TLR4-transfzierter HEK293-Zellen nach Stimulation mit *J. psychrophilus* und *Lb. curvatus*

HEK293-Zellen wurden transient mit TLR2- oder TLR4-Plasmiden transfiziert, für 18 h mit den angegebenen Stimulanten oder Medium (Ktr) inkubiert und die Konzentration von CXCL8 in den Überständen mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler von n = 14.

Sowohl die 18-stündige Inkubation TLR2-transfzierter HEK-Zellen mit *J. psychrophilus* als auch mit *Lb. curvatus* führt zu einer Freisetzung von CXCL8 (Abb.3, links), wobei von beiden Spezies eine Konzentration von 10⁶ KBE/ml nicht ausreicht, um eine CXCL8-Menge freizusetzen, die deutlich über der mit Medium behandelten Zellen liegt. Nach Stimulation mit 10⁷ KBE/ml hingegen konnten höhere Konzentrationen von CXCL8 im Überstand gemessen werden. Die Stimulation der HEK-Zellen mit 10⁷ KBE/ml von *J. psychrophilus* bewirkt eine fast doppelt so hohe CXCL8-Ausschüttung wie die mit 500 nM des TLR2-Liganden P₃CSK₄ (1800 pg/ml vs. 1100 pg/ml). Mit der gemessenen mittleren CXCL8-Konzentration von etwa 500 pg/ml zeigt eine Behandlung mit 10⁷ KBE/ml von *Lb. curvatus* eine deutlich geringere Aktivierung über TLR2.

Eine TLR4-Aktivität hingegen konnte weder für *J. psychrophilus* noch für *Lb. curvatus* nachgewiesen werden. Lediglich die Stimulation mit 100 ng/ml des TLR4-Liganden LPS führte zu einer Freisetzung von CXCL8 durch TLR4-transfizierte HEK-Zellen (Abb.3, rechts).

3.1.2 Aktivierung und Reifung humaner DCs durch Stimulation mit *Jeotgalicoccus psychrophilus* W713 und *Lactobacillus curvatus*

Nachdem für beide Kuhstallisolate nachgewiesen werden konnte, dass sie Zellen sowohl über intrazelluläre (NOD2) als auch extrazelluläre (TLR2) Rezeptoren aktivieren können (siehe 3.1.1, S.40), wurde zunächst überprüft, inwieweit die beiden Spezies in der Lage sind,

Ergebnisse

humane, Monozyten-generierte DCs, die von Natur aus neben NOD1, TLR3 und TLR4 auch NOD2 sowie TLR2 exprimieren¹⁷¹, zu aktivieren.

Zu diesem Zweck wurden humane, aus Monozyten generierte DCs mit verschiedenen Konzentrationen von *J. psychrophilus* und *Lb. curvatus* stimuliert und die freigesetzte Menge der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α im Überstand mittels ELISA bestimmt. Als Positivkontrolle wurde LPS verwendet, ein Stimulus, der eine Reihe verschiedener Mediatoren über TLR4 induzieren kann.

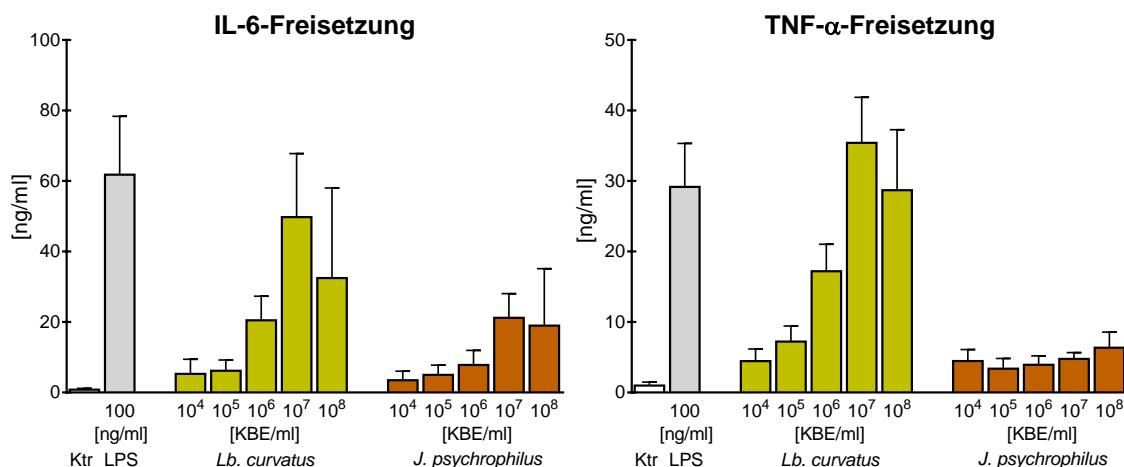


Abb.4: Freisetzung von IL-6 und TNF- α aus humanen DCs nach Stimulation mit *J. psychrophilus* und *Lb. curvatus*

Humane DCs wurden für 20 h mit den angegebenen Stimulanten oder Medium (Ktr) inkubiert und die Konzentration von IL-6 und TNF- α in den Überständen mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler von n = 14-28 Spendern (n=2 bei Stimulationen mit 10^8 KBE/ml).

Die Stimulation humaner DCs mit *Lb. curvatus* bewirkt die Freisetzung der beiden untersuchten Zytokinen IL-6 und TNF- α (Abb.4). Dabei zeigt sich eine starke Konzentrationsabhängigkeit. Schon nach Stimulation mit 10^4 und 10^5 KBE/ml werden Zytokinmengen ermittelt, die bereits deutlich über denen der Medium-Kontrollen liegen. Mit zunehmender Bakterienkonzentration (10^6 KBE/ml) steigt die freigesetzte Zytokinmenge weiter an, erreicht ein Maximum durch Stimulation mit 10^7 KBE/ml und nimmt nach Behandlung mit noch höherer Konzentration (10^8 KBE/ml) wieder ab. Die maximal durch *Lb. curvatus* freigesetzte IL-6-Menge liegt geringfügig unter der der LPS-Kontrolle (Abb.4, links). In Bezug auf TNF- α bewirkt eine Stimulation mit 10^7 KBE/ml *Lb. curvatus* eine stärkere Induktion als 100 ng/ml LPS (Abb.4, rechts).

Auch bei der Stimulation mit *J. psychrophilus* zeigt sich bei der IL-6-Freisetzung eine Konzentrationsabhängigkeit, wobei die maximale IL-6-Freisetzung sowohl nach Stimulation

Ergebnisse

mit 10^7 KBE/ml als auch mit 10^8 KBE/ml gemessen wurde. Im Gegensatz dazu wurden durch alle zur Stimulation verwendeten Konzentrationen von *J. psychrophilus* (10^4 - 10^8 KBE/ml) in etwa die gleichen Mengen an TNF- α sezerniert. Gemessen an der Induktion von IL-6 und TNF- α aktiviert *Lb. curvatus* die DCs deutlich stärker als *J. psychrophilus*. So werden bei Verwendung von 10^7 oder 10^8 KBE/ml *J. psychrophilus* Zytokinmengen freigesetzt, die durch Stimulation mit *Lb. curvatus* bereits durch 10^6 KBE/ml (IL-6) oder 10^4 KBE/ml (TNF- α) erreicht werden.

Einhergehend mit der Aktivierung humaner DCs ist deren Reifung, welche u.a. durch die Hochregulation verschiedener kostimulatorischer Moleküle gekennzeichnet ist. Zu diesen zählen auch die Moleküle CD80 und CD86⁴⁵, deren Oberflächenexpression nach Bakterien- oder LPS-Stimulation mittels FACS-Analysen bestimmt wurde.

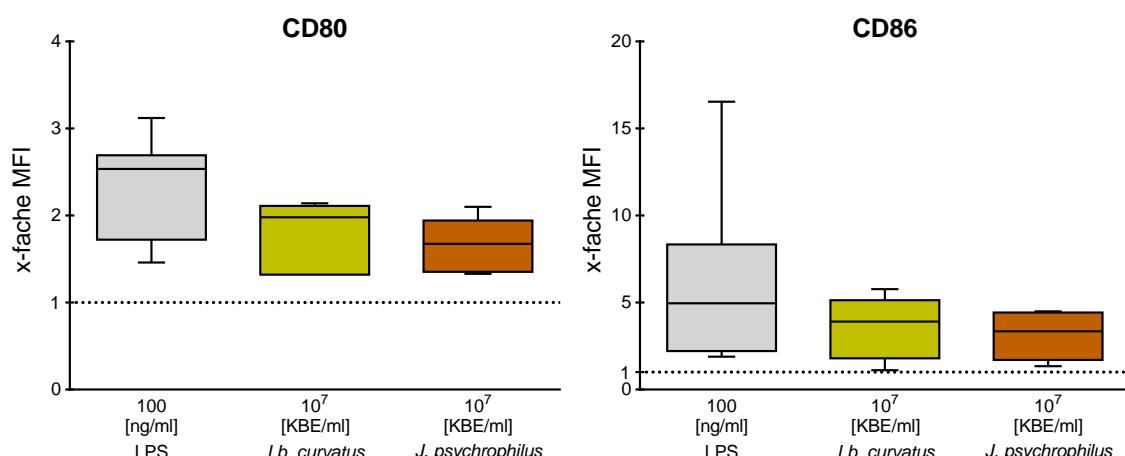


Abb.5: Expression kostimulatorischer Moleküle auf humanen DCs nach Stimulation mit *J. psychrophilus* und *Lb. curvatus*
Humane DCs wurden für 20 h mit den angegebenen Stimulationen oder Medium inkubiert und die Oberflächenexpression von CD80 und CD86 mittels FACS bestimmt. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) mit Median von $n=6$ Spendern normalisiert auf die jeweiligen Medium-Kontrollen.

Genau wie für LPS kann für beide Bakterien eine Hochregulation der Oberflächenexpression von CD80 und CD86 nach 20 h festgestellt werden (Abb.5). Dabei lässt sich erkennen, dass durch LPS-Stimulation immer die stärkste Hochregulation induziert wird, die schwächste jeweils durch Stimulation mit *J. psychrophilus* (10^7 KBE/ml). Es ist zu erkennen, dass die Expression von CD86 durch alle drei verwendeten Stimuli generell deutlich stärker induzierbar ist als die von CD80. So ist die errechnete x-fache MFI von CD86 im Median 3,5-5 Mal so hoch wie die der unstimulierten Kontrollen, bei CD80 liegen die Werte zwischen 1,8 und 2,5.

3.2 Einfluss einer Stimulation mit *Jeotgalicoccus psychrophilus* W713 und *Lactobacillus curvatus* auf die T-Zell-Polarisierung

Bisherige Veröffentlichungen zeigen, dass die allergieprotektiven Eigenschaften der drei Kuhstallisolate *L. lactis*, *A. Iwoffii* und *S. sciuri* u.a. auf deren Fähigkeiten, die T-Zell-Polarisation zu beeinflussen, beruhen. DCs liefern in diesem Kontext nicht nur das entscheidende Zytokinprofil, sondern auch eine Vielzahl von Oberflächenmolekülen, welche die Ausrichtung einer T-Zellantwort maßgeblich beeinflussen können. Aus diesem Grunde wird in nachfolgendem Abschnitt untersucht, welche T-Zell-polarisierenden Faktoren durch Stimulation mit *Lb. psychrophilus* und *J. psychrophilus* in DCs induziert werden und inwieweit sich diese auf die T-Zell-Polarisierung auswirken.

3.2.1 Induktion T_{H1} -assoziierter Moleküle

Allergien und Asthma resultieren aus einer überschießenden T_{H2} -Immunantwort. Aktuell werden zwei mögliche Gründe für dieses T_{H1}/T_{H2} -Ungleichgewicht diskutiert: zum einen eine fehlende Aktivierung der T_{H1} -Immunantwort („fehlende Immunpolarisierung“), zum anderen eine verminderte Suppression der T_{H2} -Aktivität durch T_{reg} -Zellen („fehlende Immunsuppression“, siehe auch 1.8.3., S.25)

Das am stärksten in Richtung T_{H1} -polarisierende Zytokin, das von DCs ausgeschüttet wird, ist IL-12p70. Mittels ELISA wurde überprüft, ob eine Stimulation von DCs mit *Lb. psychrophilus* und *J. psychrophilus* zur Freisetzung dieses Zytokins führt. Da bekannt ist, dass das allergieprotektive Kuhstallisolat *L. lactis* in der Lage ist, ein T_{H1} -polarisierendes Programm in DCs zu induzieren, wurde dieses bei Untersuchungen zur Induktion T_{H1} -assoziierter Moleküle als Positivkontrolle verwendet.

Ergebnisse

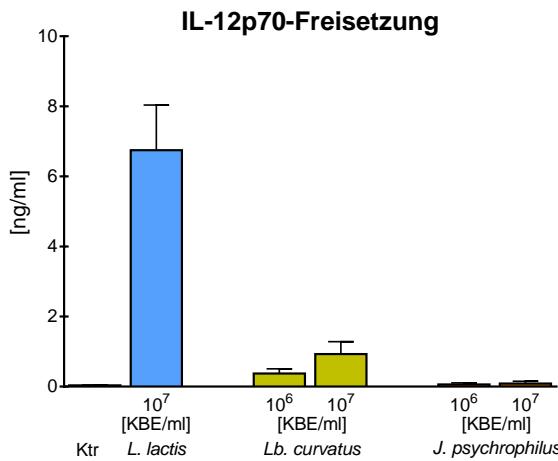


Abb.6:Freisetzung von IL-12p70 aus humanen DCs nach Stimulation mit *J. psychrophilus* und *Lb. curvatus*

Humane DCs wurden für 20 h mit den angegebenen Stimulantien oder Medium (Ktr) inkubiert und die Konzentration von IL-12p70 in den Überständen mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler von n =6-23 Spendern.

Anhand der in Abb.6 dargestellten Messdaten lässt sich erkennen, dass eine Stimulation von DCs mit *J. psychrophilus* zu keiner deutlichen Freisetzung von IL-12p70 führt. Auch höher konzentrierte Stimulationsansätze mit *J. psychrophilus* führen zu keiner messbaren Freisetzung dieses Zytokins aus DCs (Daten nicht gezeigt). Nach einer 20-stündigen Inkubation humaner DCs mit *Lb. curvatus* hingegen können insbesondere nach Verwendung von 10^7 KBE/ml geringe Mengen von IL-12p70 detektiert werden. Diese entsprechen mit circa 1 ng/ml in etwa einem Siebtel der Menge, die durch die gleiche Konzentration des starken IL-12-p70-Induktors *L. lactis* freigesetzt wird.

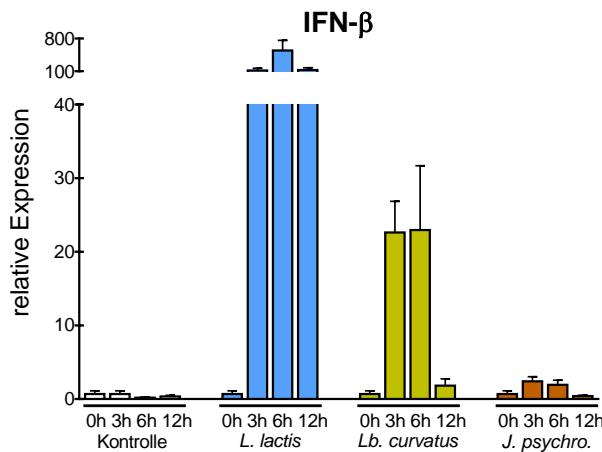


Abb.7:Expression der IFN- β -mRNA in humanen DCs nach Stimulation mit *J. psychrophilus* und *Lb. curvatus*

Humane DCs wurden für 0, 3, 6 und 12 h mit 10^7 KBE/ml der angegebenen Bakterien oder Medium (Ktr) inkubiert. Die Expression wurde relativ zu den Referenzgenen HPRT, B2M und PGK1 mittels qPCR bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler von n=7 Spendern.

Ergebnisse

IFN- β ist ein weiteres, von DCs sezerniertes Zytokin, das mit einer T_H1-Polarisierung naiver T-Zellen in Verbindung gebracht wird. Die mRNA-Expression dieses Zytokins über einen Zeitraum von 12 h nach Stimulation mit *J. psychrophilus* oder *Lb. curvatus* wurde mittels RT-qPCR untersucht (Abb.7).

Eine Stimulation humaner DCs mit 10^7 KBE/ml *L. lactis* induziert einen drastischen Anstieg der IFN- β -mRNA Expression mit einem Maximum nach 6 h. Im Vergleich dazu führte eine Stimulation mit 10^7 KBE/ml *Lb. curvatus* und *J. psychrophilus* zu einer deutlich geringeren relativen Genexpression. Im Falle von *Lb. curvatus* steigt die relative mRNA-Induktion nach 3 h und 6 h auf das maximal 20-fache, während eine Inkubation der DCs mit *J. psychrophilus* zum gleichen Zeitpunkt eine maximale relative Expression von 2,4 induziert. Nach Behandlung der DCs mit reinem Medium kann innerhalb des gewählten Untersuchungszeitraumes von bis zu 12 h zu keinem Zeitpunkt eine erhöhte mRNA-Expression gemessen werden.

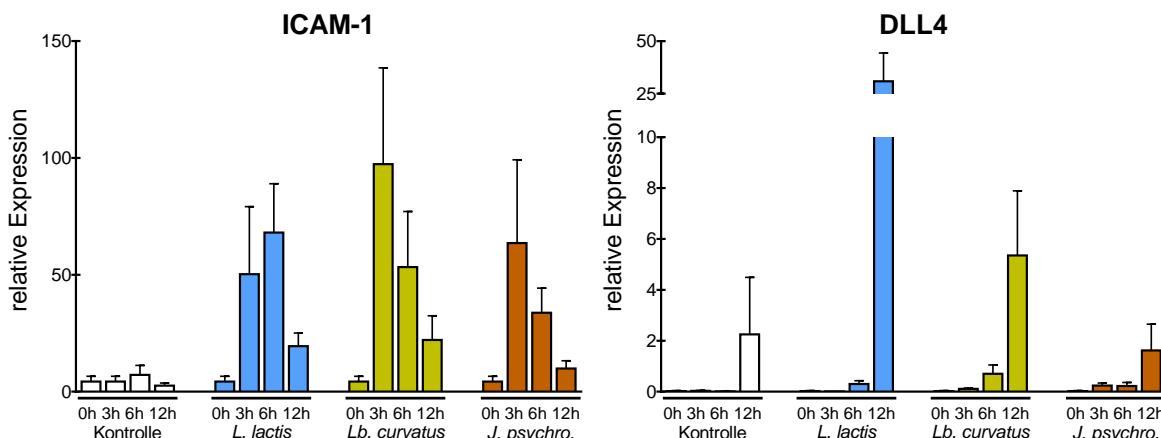


Abb.8: Expression der ICAM- und DLL4-mRNA in humanen DCs nach Stimulation mit *J. psychrophilus* und *Lb. curvatus*
Humane DCs wurden für 0, 3, 6 und 12 h mit 10^7 KBE/ml der angegebenen Bakterien oder Medium (Ktr) inkubiert. Nach Gewinnung der RNA und anschließender reverser Transkription wurde die Expression mittels qPCR relativ zu den Referenzgenen HPRT, B2M und PGK1 bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler von n=7 Spendern.

Da auch die auf der Oberfläche von DCs exprimierten Moleküle ICAM-1 und DLL4 mit einer T_H1-Polarisierung assoziiert sind, wurden diese einer Expressionsanalyse mittels RT-qPCR unterzogen. Sowohl die Stimulation humaner DCs mit *J. psychrophilus* als auch mit *Lb. curvatus* führt zu einem Anstieg der mRNA-Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (Abb.8, links). Dabei führen beide Stimuli zu ähnlichen Kinetiken: ausgehend von einer bereits im unstimulierten Zustand erhöhten Grundexpression erreichen beide Verläufe nach

Ergebnisse

3 h ihr Maximum und sinken innerhalb der nächsten 6 h wieder ab, die unstimulierten Kontrollen zeigen in diesem Zeitraum keine veränderte Expression. Während das Expressionsniveau nach 12 h unter Einfluss von *J. psychrophilus* wieder in etwa dem des Ausgangsniveaus entspricht, ist dieses nach Stimulation mit *Lb. curvatus* nach 12 h noch immer leicht erhöht und liegt in etwa auf derselben Höhe wie der 12-Stunden-Wert der Positivkontrolle (*L. lactis*). Generell zeigen die Daten, dass eine Inkubation humaner DCs mit *Lb. curvatus* die ICAM-1-mRNA am stärksten induziert, während die Stimulation mit *J. psychrophilus* die messbare Menge an mRNA in etwa so stark erhöht, wie es auch eine Stimulation mit der gleichen Menge von *L. lactis* vermag.

In Bezug auf die mRNA-Expression des Notch-Liganden DLL4 zeigen sich für beide bakterielle Stimulationen ebenfalls sehr ähnliche Verläufe, die mit der Positivkontrolle (*L. lactis*) vergleichbar ist (Abb.8, rechts) und sich lediglich in der Stärke der Expression unterscheiden. So erreichen alle drei Expressionsniveaus nach 12-stündiger Simulation ihr jeweiliges Maximum, ein leichter Anstieg der Expression ist bereits nach 6 h zu erkennen. Die höchste Expression der DLL4-mRNA wird unter Einfluss von *L. lactis* induziert, die schwächste durch *J. psychrophilus*. Diese entspricht allerdings in etwa der, die auch nach 12 h ohne Stimulation in den Zellen gemessen werden konnte (Ktr). Unter Berücksichtigung dieser Tatsache beruht die nach 12 h gemessene Erhöhung der mRNA-Menge nicht auf der Wirkung des *J. psychrophilus*.

Die bisher gezeigten Daten zeigen, dass eine Stimulation mit *Lb. curvatus* alle der untersuchten T_H1-polarisierenden Moleküle in DCs induzieren kann, eine Stimulation humaner DCs mit *J. psychrophilus* hingegen führte lediglich zur Expressionserhöhung der ICAM-1-mRNA. Um zu klären, inwieweit diese Effekte ausreichen, um tatsächlich eine T_H1-Ausrichtung naiver T-Zellen zu induzieren, wurden DCs und TCs zusammen kultiviert (Kokultur) und nach fünf Tagen auf verschiedene T_H1-assozierte Moleküle hin untersucht. Zunächst wurde die mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors T-bet in T-Zellen überprüft, die mit *Lb. curvatus*- oder *J. psychrophilus*-stimulierten DCs kokultiviert wurden. Dieser auch als „T_H1-Master Regulator“ bezeichnete Faktor wird während der T_H1-Differenzierung stark hochreguliert.

Ergebnisse

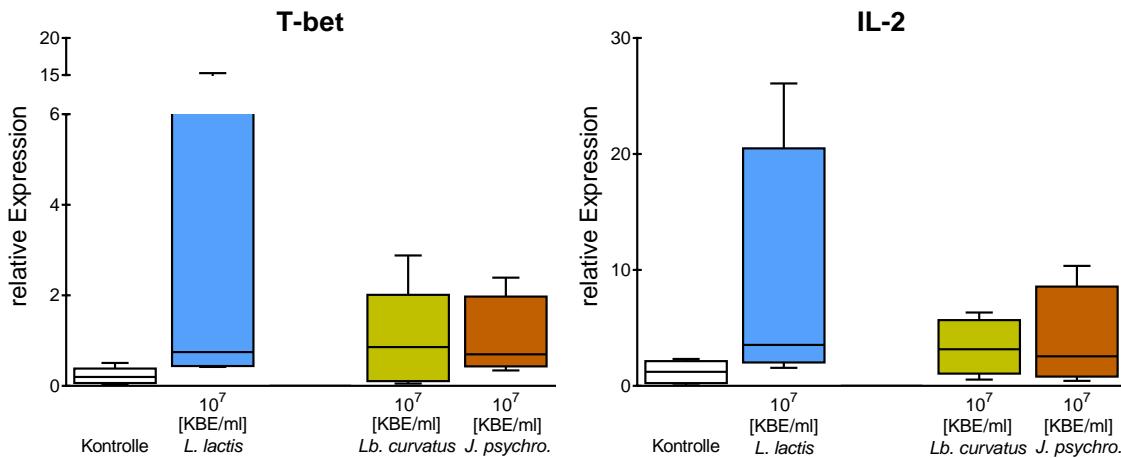


Abb.9: Expression der T-bet- und IL-2-mRNA in Kokulturen humaner DCs mit autologen T-Zellen nach Stimulation mit *J. psychrophilus* und *Lb. curvatus*

Humane DCs wurden für 20 h mit den angegebenen Stimulantien oder Medium (Ktr) inkubiert und anschließend für 5 Tage mit naiven, autologen CD4⁺ T-Zellen im Verhältnis 1:10 (DC:TC) kokultiviert. Nach Gewinnung der RNA und anschließender reverser Transkription wurde die Expression mittels qPCR relativ zu den Referenzgenen HPRT, RPL27 und RPL30 bestimmt. Dargestellt sind die zusammengefassten Daten von n=6 Spendern als Boxplot nach Tukey.

Alle drei verwendeten Bakterien induzieren eine Expressionserhöhung der T-bet-mRNA (Abb.9, links). Die Mediane der relativen Expression aller drei Bedingungen liegen in etwa in demselben, im Vergleich zur Mediumkontrolle erhöhtem, Bereich (*L. lactis*: 1,4, *J. psychrophilus* und *Lb. curvatus*: 0,9). Dennoch kann unter Einbezug der Streuung der Daten, die aus Kokulturen mit *L. lactis*-vorstimulierten DCs resultieren, ausgesagt werden, dass die Expression unter Einfluss dieses Bakteriums am stärksten hochreguliert wird.

Ähnlich verhält es sich mit der relativen mRNA-Expression des von vornehmlich T_H1-Zellen sezernierten Zytokins IL-2. Das höchste Expressionsniveau wird durch die *L. lactis*-stimulierten DCs induziert (Median: 3,8) und auch die Datenstreuung ist nach dieser Stimulation am größten. Die medianen, relativen Expressionen der durch *J. psychrophilus*- oder *Lb. curvatus*-aktivierten Kokulturen sind etwa gleich hoch (2,8) und liegen nur geringfügig über den höchsten Expressionslevels der unstimulierten Kontrollen (Bereich in der Box oberhalb des Medians). Dementsprechend weisen in der Hälfte der Versuche die T-Zellen eine IL-2-mRNA-Expression auf, die zum Teil auch in den unstimulierten Kokulturen nachweisbar ist. Die anderen 50 % der Datenpunkte jedoch zeigen im Vergleich zu den unstimulierten Kokulturen eine Erhöhung, insbesondere nach *J. psychrophilus*-Stimulation.

Ergebnisse

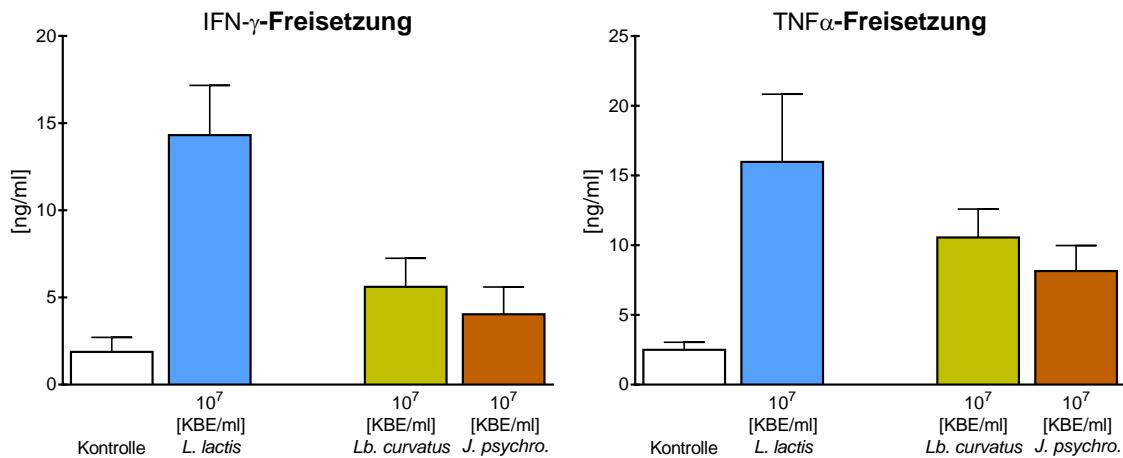


Abb.10: Freisetzung von IFN- γ und TNF- α aus Kokulturen humaner DCs mit autologen T-Zellen nach Stimulation mit *J. psychrophilus* und *Lb. curvatus*

Humane DCs wurden für 20 h mit den angegebenen Stimulantien oder Medium (Ktr) inkubiert und anschließend für 5 Tage mit naiven, autologen CD4 $^+$ T-Zellen im Verhältnis 1:10 (DC:TC) kokultiviert. Nach 5-stündiger Restimulation mit PMA/Ionomycin wurde die Konzentration von IFN- γ und TNF- α in den Überständen mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler von n =14 Spendern.

Neben IL-2 sind auch IFN- γ und TNF- α typische, von T H 1-Zellen stammende Zytokine. Deren Mengen in den Überständen fünf Tage alter Kokulturen, die für 5 h mit PMA/Ionomycin restimuliert wurden, wurden mittels ELISA bestimmt (Abb.10).

Sowohl *J. psychrophilus*- als auch *Lb. curvatus*-stimulierte DCs bewirken eine messbare Freisetzung von IFN- γ und TNF- α in DC-TC-Kokulturen, wobei nach Vorbehandlung der DCs mit *Lb. curvatus* von beiden Zytokinen eine etwas größere Menge detektierbar ist (IFN- γ : 5,6 vs. 4 ng/ml, TNF- α : 10,5 vs. 8 ng/ml). Dennoch induzieren diese beiden Spezies die Zytokinfreisetzung deutlich geringer als es eine Stimulation mit *L. lactis* vermag (jeweils \sim 15 ng/ml). Es darf nicht außer Acht gelassen werden, dass auch Kokulturen mit unstimulierten DCs (Ktr) bereits zur Induktion geringer Mengen an IFN- γ und TNF- α führen (1,8 und 2,4 ng/ml), wodurch sich die tatsächlich durch die Stimuli induzierten Zytokinmengen etwas reduzieren. Dass nicht die DCs sondern die TCs die Quellen dieser Zytokine sind, machen Kontrollen deutlich, in denen DCs in Abwesenheit von TCs unter ansonsten gleichen Bedingungen stimuliert und kultiviert wurden. In diesen Überständen konnten die Zytokine nur im pg-Bereich oder gar nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse

3.2.2 Induktion T_H2-assoziierter Moleküle

Da u.a. eine Verschiebung des T-Zell-Verhältnisses zugunsten der T_H2-Zellen die Entstehung von Allergien und Asthma begünstigt, wurden auch eine Reihe T_H2-assoziierter Faktoren nach Behandlung von humanen DCs mit *J. psychrophilus* oder *Lb. curvatus* untersucht. Stimulationen mit LPS wurden in diesem Abschnitt als Positivkontrollen verwendet.

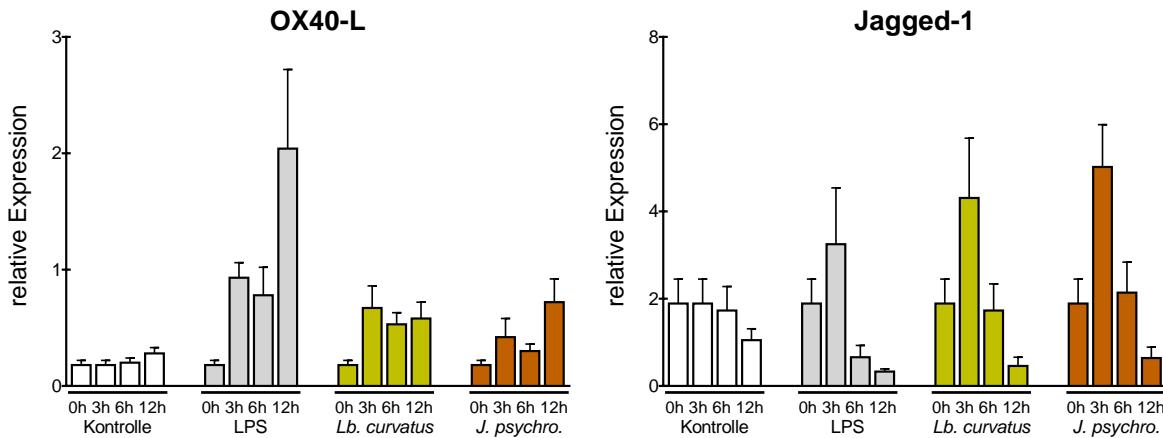


Abb.11: Expression der OX40-L- und Jagged-1-mRNA in humanen DCs nach Stimulation mit *J. psychrophilus* und *Lb. curvatus*

Humane DCs wurden für 0, 3, 6 und 12 h mit 10^7 KBE/ml der angegebenen Bakterien, 100 ng/ml LPS oder Medium (Ktr) inkubiert. Nach Gewinnung der RNA und anschließender reverser Transkription wurde die Expression mittels qPCR relativ zu den Referenzgenen HPRT, B2M und PGK1 bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler von n=7 Spendern.

Wie bereits in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, wurden Kinetiken der mRNA-Expression der Oberflächenmoleküle OX40-L und Jagged-1 erstellt. Beide stellen kostimulatorische Moleküle dar, die eine Differenzierung naiver T-Zellen in Richtung T_H2 begünstigen.

In Bezug auf die Expression der OX40-L-mRNA kann sowohl für *J. psychrophilus*- als auch *Lb. curvatus*- stimulierte DCs ein leichter Anstieg im Vergleich zur Mediumkontrolle verzeichnet werden. (Abb.11, links). Sowohl nach bakterieller als auch nach LPS-Stimulation lassen sich in der Tendenz ähnliche Kinetiken erkennen: Nach den ersten 3 h ist ein Anstieg zu verzeichnen, innerhalb der nächsten 3 h sinken die jeweiligen Expressionen wieder geringfügig um nach insgesamt 12-stündiger Stimulation das jeweilige Maximum zu erreichen. Dabei weisen die mit LPS-stimulierten DCs die höchsten Expressionsniveaus auf (Mittelwert des Maximums: 2), die relativen Expressionen in DCs, die mit *J. psychrophilus* oder *Lb. curvatus* stimuliert wurden, sind etwas niedriger und untereinander vergleichbar (Mittelwert des Maximums *J. psychrophilus*: 0,72, *Lb. curvatus*: 0,58).

Ergebnisse

In Relation zu der bereits in unstimulierten Zellen gemessenen mRNA-Expression von OX40-L ergibt sich in *J. psychrophilus*-stimulierten DCs maximal ein 3-facher Anstieg (Mittelwerte), nach *Lb. curvatus*-Stimulationen maximal eine etwa 5,3-fach stärkere Expression (Darstellung der Daten als n-fache Expression der Mediumkontrolle nicht gezeigt).

Auch die Kinetiken der mRNA-Expression von Jagged-1 zeigen unter dem Einfluss aller drei Stimuli sehr ähnliche Verläufe (Abb.11, rechts): ausgehend von einer bereits in unstimulierten Zellen ermittelten Expression zeigen alle drei Kinetiken nach 3 h einen leichten Anstieg, sinken aber innerhalb der nächsten 9 h wieder ab und haben nach 12 h ein Niveau erreicht, das nicht nur deutlich unter dem des Ausgangswertes liegt, sondern auch unter dem der Mediumkontrolle. Demnach kann- trotz der ebenfalls leicht reduzierten Expression von Jagged-1 in den unstimulierten Zellen (Ktr) nach 12 h- von einer Herunterregulation der Jagged-1-mRNA-Expression durch längere Behandlung humaner DCs mit *J. psychrophilus* oder *Lb. curvatus* im Vergleich zu den Kontrollzellen ausgegangen werden. Dabei wird die stärkste Abnahme durch Behandlung mit LPS induziert (4,2-fache Runterregulierung in Relation zu den unbehandelten Zellen), die schwächste durch Inkubation mit *Lb. curvatus* (1,2-fach), die Behandlung mit *J. psychrophilus* induziert eine 1,2-fache Abnahme im Vergleich zu den unstimulierten DCs (Darstellung der Daten als n-fache Expression der Mediumkontrolle nicht gezeigt).

Da die Frage, ob die Behandlung humaner DCs mit *J. psychrophilus* oder *Lb. curvatus* zu einer Abnahme T_H2-polarisierender Moleküle führt, anhand der Expressionsanalyse der kostimulatorischen Moleküle OX40-L und Jagged-1 allein nicht eindeutig beantwortet werden kann, wurden wie zuvor beschrieben Kokulturen humaner DCs mit autologen, naiven TCs angezogen und auf das Vorhandensein charakteristischer T_H2 Merkmale untersucht. Auf mRNA-Ebene wurde die Expression der vornehmlich von T_H2-Zellen sezernierten Zytokine IL-5 und IL-13 analysiert.

Ergebnisse

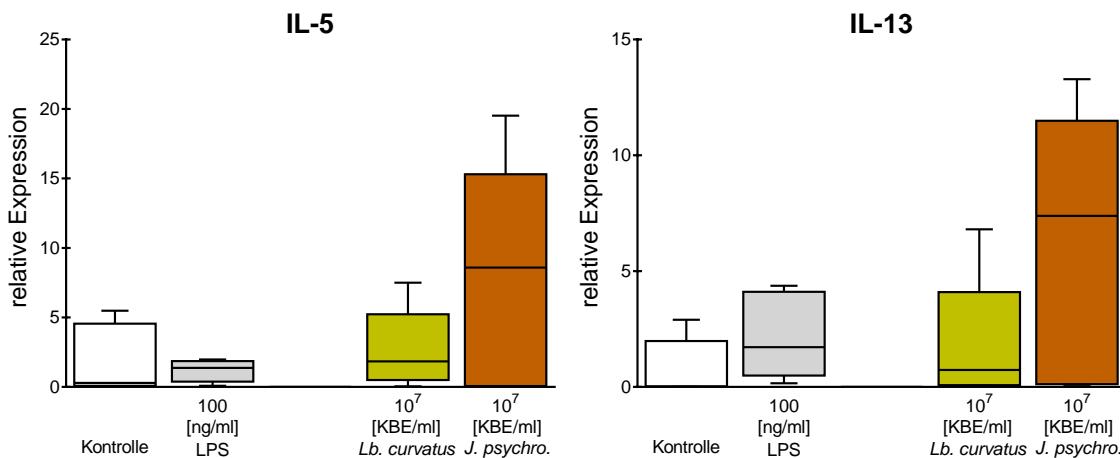


Abb.12: Expression der IL-5- und IL-13-mRNA in Kokulturen humaner DCs mit autologen T-Zellen nach Stimulation mit *J. psychrophilus* und *Lb. curvatus*

Humane DCs wurden für 20 h mit den angegebenen Stimulanten oder Medium (Ktr) inkubiert und anschließend für 5 Tage mit naiven, autologen CD4⁺ T-Zellen im Verhältnis 1:10 (DC:TC) kokultiviert. Nach Gewinnung der RNA und anschließender reverser Transkription wurde die Expression mittels qPCR relativ zu den Referenzgenen HPRT, RPL27 und RPL30 bestimmt. Dargestellt sind die zusammengefassten Daten von n=5 Spendern als Boxplot nach Tukey.

Die mRNA von IL-5 lässt sich zu einem Großteil bereits in den unstimulierten Kontrollen (Ktr) nachweisen (Abb.12, links). Eine Vorbehandlung der DCs mit *Lb. curvatus* führt zu einer leichten Veränderung der IL-5-Expression, der Median liegt im Vergleich zur Mediumkontrolle etwas höher. Unter Einfluss des *J. psychrophilus* kommt es zu einer deutlichen Zunahme der gemessenen IL-5-mRNA. Bei der Hälfte der Versuche wurde eine Expression ermittelt, die höher ist als die höchsten Expressionen, die in unstimulierten Zellen gemessen wurden. Die LPS-Vorstimulation hingegen induziert insgesamt eine Abnahme der Expression.

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei der Betrachtung der mRNA-Daten von IL-13 (Abb.12, S.53, links): die mediane Expression der *Lb. curvatus*-aktivierten Kokulturen ist im Vergleich zu den Kontrollkulturen leicht erhöht, die Vorbehandlung der DCs mit *J. psychrophilus* hingegen induziert eine weitaus stärkere Hochregulation der mRNA-Expression.

Ergebnisse

Des Weiteren wurden die Kokulturen auf das Vorhandensein der mRNA des T_H2-spezifischen Transkriptionsfaktors GATA3 hin überprüft.

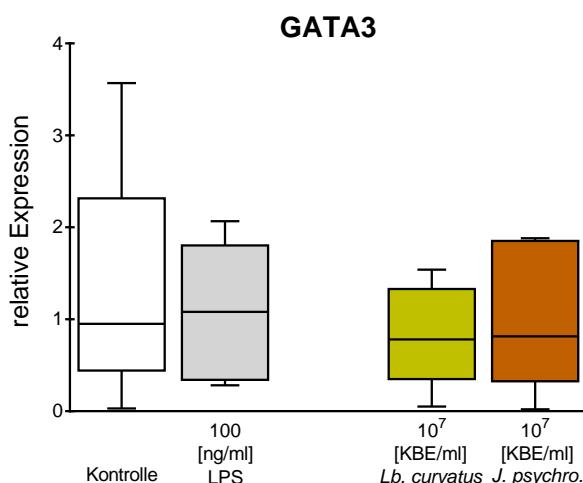


Abb.13: Expression der GATA3-mRNA in Kokulturen humaner DCs mit autologen T-Zellen nach Stimulation mit *J. psychrophilus* und *Lb. curvatus*

Humane DCs wurden für 20 h mit den angegebenen Stimulantien oder Medium (Ktr) inkubiert und anschließend für 5 Tage mit naiven, autologen CD4⁺ T-Zellen im Verhältnis 1:10 (DC:TC) kokultiviert. Nach Gewinnung der RNA und anschließender reversen Transkription wurde die Expression mittels qPCR relativ zu den Referenzgenen HPRT, RPL27 und RPL30 bestimmt. Dargestellt sind die zusammengefassten Daten von n=6 Spendern als Boxplot nach Tukey.

Die mRNA des Transkriptionsfaktors GATA3 lässt sich bereits in nicht aktivierten Kokulturen nachweisen (Abb.13). Mit Bezug auf diesen Befund führt die Stimulation humaner DCs sowohl mit LPS als auch mit *Lb. curvatus* oder *J. psychrophilus* zumindest in einigen Spendern zu einer Abnahme der GATA3-mRNA-Menge in TCs. Im Median liegt die Expression aller vier unterschiedlich aktivierten Kokulturen auf einem vergleichbaren Niveau.

Ergebnisse

Darüber hinaus wurden in den Überständen dieser Kokulturen die Mengen des typischerweise von T_H2-Zellen freigesetzten Zytokins IL-4 bestimmt.

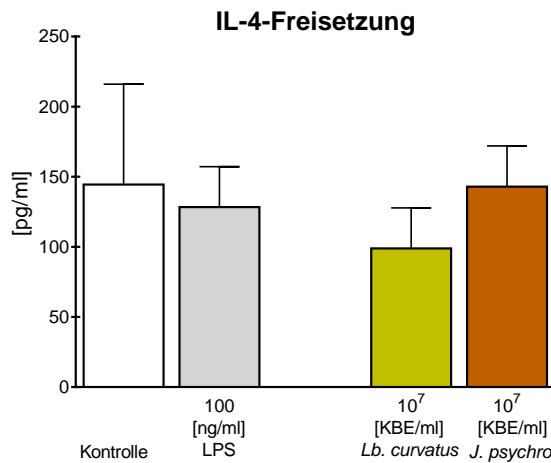


Abb.14: Freisetzung von IL-4 aus Kokulturen humaner DCs mit autologen T-Zellen nach Stimulation mit *J. psychrophilus* und *Lb. curvatus*

Humane DCs wurden für 20 h mit den angegebenen Stimulantien oder Medium (Ktr) inkubiert und anschließend für 5 Tage mit naiven, autologen CD4⁺ T-Zellen im Verhältnis 1:10 (DC:TC) kokultiviert. Nach 5-stündiger Restimulation mit PMA/Ionomycin wurde die Konzentration von IL-4 in den Überständen mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler von n=7 Spendern.

Wie die Daten in Abb.14 zeigen, lassen sich generell in den Überständen von Kokulturen humaner DCs mit autologen, naiven TCs nur sehr geringe Mengen von IL-4 nachweisen. Bereits Kokulturen, die unstimulierte DCs enthalten, sezernieren IL-4. Weder durch bakterielle noch durch LPS-Vorbehandlung der DCs wurde die Freisetzung erhöht.

3.2.3 Induktion T_{reg}-assozierter Moleküle

Neben der „fehlenden Immunpolarisierung“ als Theorie zur Entstehung von Asthma und Allergien gibt es die „fehlende Immunsuppression“. Eine zentrale Rolle bei der Immunsuppression spielen die T_{reg}-Zellen, da sie in der Lage sind, sowohl T_H1-als auch T_H2-vermittelte Immunantworten zu unterdrücken. Vor diesem Hintergrund wurde eine Reihe von Faktoren untersucht, die im Zusammenhang mit einer T_{reg}-Polarisation stehen. Einer dieser Faktoren ist IL-10, ein immunregulatorisches Zytokin, welches unter bestimmten Voraussetzungen von DCs freigesetzt werden kann und die Entwicklung naiver T-Zellen in Richtung T_{reg} induziert. Aus diesem Grund wurde die IL-10-Freisetzung nach 20-stündiger Stimulation humaner DCs mit *Lb. curvatus* oder *J. psychrophilus* gemessen.

Wie die ELISA-Messdaten in Abb.15 (links) zeigen, führt die Stimulation humaner DCs sowohl mit *J. psychrophilus* als auch mit *Lb. curvatus* zur Freisetzung von IL-10, allerdings in

Ergebnisse

unterschiedlichem Ausmaß. So wurde nach Behandlung der DCs mit 10^7 KBE/ml von *J. psychrophilus* in etwa die gleiche IL-10-Menge detektiert, die bereits durch Stimulation mit 10^6 KBE/ml des *Lb. curvatus* freigesetzt wurde. Eine Erhöhung der *Lb. curvatus*-Konzentration um den Faktor zehn führt zu einer deutlichen Steigerung der IL-10-Produktion. Diese ist deutlich höher als nach DC-Behandlung mit 100 ng/ml LPS. Eine Inkubation der Zellen mit 10^6 KBE/ml *J. psychrophilus* führt zwar zu einer Ausschüttung von IL-10, die detektierten Mengen sind aber nur unwesentlich größer, als diejenigen, die bereits von unstimulierten DCs sezerniert werden (Ktr).

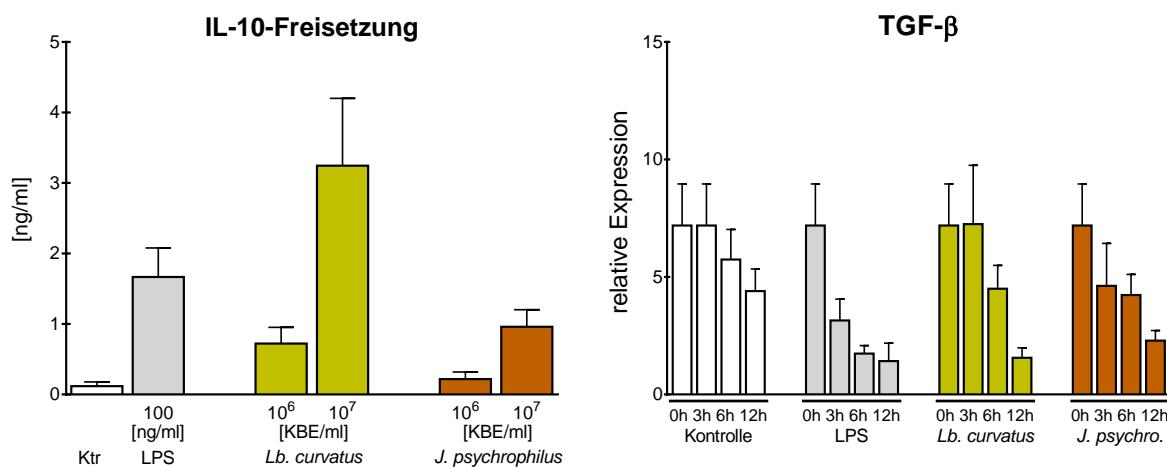


Abb.15: Freisetzung von IL-10 und Expression der TGF-β-mRNA nach Stimulation humaner DCs mit *J. psychrophilus* und *Lb. curvatus*

links: humane DCs wurden für 20 h mit den angegebenen Stimulanten oder Medium (Ktr) inkubiert und die Konzentration von IL-10 in den Überständen mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler von n = 26 Spendern.

rechts: humane DCs wurden für 0, 3, 6 und 12 h mit 10^7 KBE/ml der angegebenen Bakterien, 100 ng/ml LPS oder Medium (Ktr) inkubiert. Nach Gewinnung der RNA und anschließender reverser Transkription wurde die Expression mittels qPCR relativ zu den Referenzgenen HPRT, B2M und PGK1 bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler von n=7 Spendern.

Ein weiteres, von DCs produziertes Zytokin ist TGF-β. Neben einer Reihe anderer Auswirkungen wird auch die Beteiligung an der Induktion T_{reg} -Zellen diskutiert¹⁷². Die mRNA-Expression dieses Signalmoleküls nach Stimulation humaner DCs mit *J. psychrophilus* oder *Lb. curvatus* wurde wie bereits beschrieben über einen Zeitraum von 12 h untersucht. Wie die Daten (Abb.15, rechts) zeigen, wird die mRNA dieses Zytokins bereits konstitutiv in unstimulierten Zellen exprimiert (Kontrolle). Unter dem Einfluss der beiden Kuhstallisolale lässt sich im Verlauf von 12 h eine deutliche, schrittweise Abnahme der relativen Expressionen erkennen. Während die Expression durch *Lb. curvatus*-Stimulation erst nach

Ergebnisse

6 h herunterreguliert wird, lässt sich eine Abnahme der mRNA-Menge unter Einfluss des *J. psychrophilus* bereits nach 3 h detektieren. Auch eine Stimulation mit LPS führt zu einer kontinuierlichen Abnahme der nachweisbaren TGF- β -mRNA in humanen DCs. Auch in Anbetracht der Tatsache, dass eine Abnahme der mRNA-Expression auch in unstimulierten DCs nachgewiesen wurde, sind die relativen Expressionen im Mittel unter allen drei Bedingungen stets geringer als die der Kontrollzellen. So wurde mit Bezugnahme auf die Mediumkontrollen die stärkste Runterregulation durch die Positivkontrolle LPS induziert (4,2-fach), nach Behandlung mit *Lb. curvatus* wurde im Mittel eine 2,6-fache und nach *J. psychrophilus*-Stimulation eine 1,8-fache Abnahme festgestellt (Darstellung der Daten als n-fache Expression der Mediumkontrolle nicht gezeigt). Zusätzlich wurde in dem bereits beschriebenen Kokultursystem untersucht, ob sich Merkmale nachweisen lassen, die auf das Vorhandensein regulatorischer T-Zellen hinweisen. Ein Molekül, anhand dessen T_{reg} -Zellen identifiziert werden, ist der Transkriptionsfaktor FoxP3, das bereits erwähnte TGF- β spielt nicht nur bei der Entwicklung regulatorischer T-Zellen eine Rolle, es wird auch von diesen selber sezerniert. Die Daten der mRNA-Expressionsanalyse dieser beiden Moleküle sind in Abb.16 zu sehen.

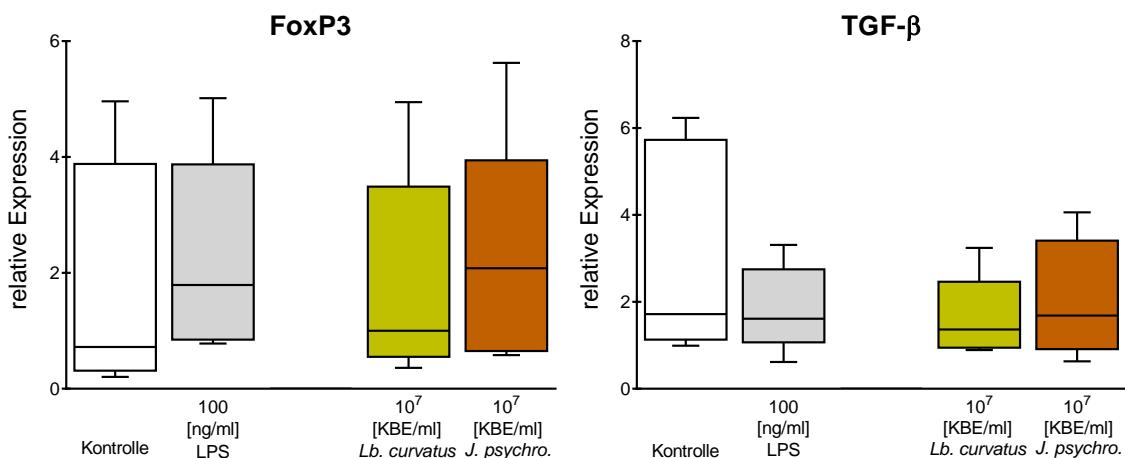


Abb.16: Expression der FoxP3- und TGF- β -mRNA in Kokulturen humaner DCs mit autologen T-Zellen nach Stimulation mit *J. psychrophilus* und *Lb. curvatus*

Humane DCs wurden für 20 h mit den angegebenen Stimulationen oder Medium (Ktr) inkubiert und anschließend für 5 Tage mit naiven, autologen CD4 $^{+}$ T-Zellen im Verhältnis 1:10 (DC:TC) kokultiviert. Nach Gewinnung der RNA und anschließender reverser Transkription wurde die Expression mittels qPCR relativ zu den Referenzgenen HPRT, RPL27 und RPL30 bestimmt. Dargestellt sind die zusammengefassten Daten von n=5 Spendern als Boxplot nach Tukey.

Die FoxP3-mRNA wird zum Teil bereits in unstimulierten Kokulturen exprimiert (Abb.16, links). Dennoch bewirkt sowohl die Vorbehandlung mit LPS als auch mit *J. psychrophilus* im

Ergebnisse

Median eine Hochregulation des Transkriptionsfaktors. Die nach Vorbehandlung der DCs mit *Lb. curvatus* entstandenen Kokulturen hingegen weisen mit Bezug auf die Mediumkontrolle keine Hochregulation der mRNA auf.

Auch die mRNA von TGF- β wird bereits in nicht aktivierte Kokulturen exprimiert (Abb.16, rechts). Unter Einfluss aller drei Vorstimulationen ist die TGF- β -mRNA-Expression im Vergleich dazu in einigen der Kokulturen geringer, im Median liegen die Werte der LPS-, *Lb. curvatus*- und *J. psychrophilus*-aktivierten Kokulturen auf etwa denselben, mit den Kontrollkulturen vergleichbaren Niveaus.

Ähnlich wie TGF- β ist auch IL-10 ein Zytokin, welches zur Differenzierung von T_{reg} -Zellen beiträgt, aber typischerweise auch selbst von dieser TC-Subpopulation freigesetzt wird. Aus diesem Grunde wurde auch die Menge dieses Zytokins in den Überständen restimulierter Kokulturen mittels ELISA bestimmt (Abb.17).

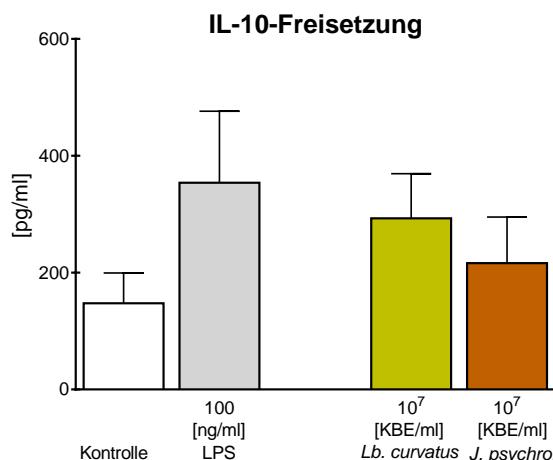


Abb.17: Freisetzung von IL-10 aus Kokulturen humaner DCs mit autologen T-Zellen nach Stimulation mit *J. psychrophilus* und *Lb. curvatus*

Humane DCs wurden für 20 h mit den angegebene Stimulanten oder Medium (Ktr) inkubiert und anschließend für 5 Tage mit naiven, autologen CD4 $^{+}$ T-Zellen im Verhältnis 1:10 (DC:TC) kokultiviert. Nach 5-stündiger Restimulation mit PMA/Ionomycin wurde die Konzentration von IL-10 in den Überständen mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler von n=14 Spendern.

Bereits in den Kontroll-Kokulturen wird IL-10 freigesetzt. Nach Vorstimulation der DCs mit *J. psychrophilus* ist die detektierbare Menge von IL-10 im Vergleich dazu leicht erhöht, die nach *Lb. curvatus*-Behandlung gemessene noch etwas höher und die stärkste IL-10 Sekretion wird unter dem Einfluss von LPS induziert.

3.3 Analyse synergistischer Effekte anhand der Freisetzung verschiedener Schlüsselzytokine nach Stimulation humaner DCs mit den drei Kuhstallbakterien *Lactococcus lactis* G121, *Acinetobacter Iwoffii* F78 und *Staphylococcus sciuri* W620

Die Auswirkung einer simultanen Stimulation humaner DCs mit 2er-Kombinationen der drei bereits in Grundzügen charakterisierten, allergieprotektiven Kuhstallisolate *L. lactis*, *A. Iwoffii* und *S. sciuri* wurden bereits im Vorfeld im Zuge meiner Masterarbeit untersucht. In dieser konnten hinsichtlich der Freisetzung aller untersuchten Zytokine - IL-6, TNF- α , IL-10 und IL-12p70 - synergistische Effekte beobachtet werden. Vor diesem Hintergrund und in Anbetracht der Tatsache, dass die von DCs sezernierten Zytokine maßgeblich die Polarisierungsrichtung naiver TCs beeinflussen, galt es zunächst, anhand der Freisetzung der Zytokine IL-6, TNF- α , IL-10 und IL-12p70 zu testen, welche der vielen möglichen bakteriellen Kombinationen synergistische Effekte induzieren.

Zu diesem Zwecke wurden humane DCs zunächst mit einer Vielzahl möglicher 3e-Kombinationen der Kuhstallbakterien *L. lactis*, *A. Iwoffii* und *S. sciuri* stimuliert und die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α bestimmt. Die Anzahl der prinzipiell möglichen Kombinationen aus drei Bakterien, verwendet in einem Konzentrationsbereich von 10^4 - 10^7 KBE/ml, wurde zunächst wie folgt eingegrenzt:

Pro Stimulationsansatz wurden je zwei der drei Bakterien in derselben Konzentration verwendet und mit jeweils allen ausgewählten Konzentrationen des dritten Bakteriums (10^4 - 10^7 KBE/ml) kombiniert. Welche Zusammenstellungen sich mit dieser Auswahl ergeben, lässt sich an nachstehender Tabelle (Tab.9) ablesen:

Tab.9: Auflistung der Kombinationen der drei Kuhstallisolate *L. lactis*, *A. Iwoffii* und *S. sciuri*, die für die Stimulation humaner DCs verwendet wurden

Kombi-nation	Konzentration [KBE/ml]															
<i>L. lactis</i>	10^4	10^5	10^6	10^7	10^4	10^5	10^6	10^7	10^4	10^5	10^6	10^7	10^4	10^5	10^6	10^7
<i>+A. Iwoffii</i>	10^4	10^5	10^6	10^7	10^4	10^5	10^6	10^7	10^4	10^5	10^6	10^7	10^4	10^5	10^6	10^7
<i>+S. sciuri</i>	10^4	10^4	10^4	10^4	10^5	10^5	10^5	10^5	10^6	10^6	10^6	10^6	10^7	10^7	10^7	10^7

Die markierte Spalte beispielsweise illustriert die Kombination aus 10^7 KBE/ml *L. lactis*, 10^7 KBE/ml *A. Iwoffii* und 10^5 KBE/ml *S. sciuri*. Zusätzlich zu den hier aufgeführten

Ergebnisse

Kombinationen ergeben sich jeweils nochmal dieselben Anzahlen an ausgetesteten Möglichkeiten für Kombinationen, bei denen *A. Iwoffii* und *S. sciuri* in derselben Konzentration verwendet wurden und für Stimulationsgemische, bei denen von *S. sciuri* und *L. lactis* jeweils die gleichen KBE/ml eingesetzt wurden. Mit diesen ersten Versuchen sollte festgestellt werden, ob sich durch den Einsatz verschiedener Kombinationen der drei Kuhstallbakterien synergistische Effekte auf die Zytokinfreisetzung erzielen lassen. Im Allgemeinen spricht man von Synergismus, wenn die **Gesamtwirkung** größer ist als die **Summe der Einzelwirkungen**. Der Summe der Einzelwirkungen entspricht im Kontext der Zytokinfreisetzung eine Addition der freigesetzten Zytokinmengen nach Einzelstimulation, die Gesamtwirkung lässt sich jeweils an der Zytokinfreisetzung, die durch eine Stimulation mit der entsprechenden bakteriellen Kombination induziert wurde, festmachen. Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, wurden die humanen DCs nicht nur mit verschiedenen Kombinationen von *L. lactis*, *A. Iwoffii* und *S. sciuri*, sondern zusätzlich noch mit jeweils allen nötigen Konzentrationen (10^4 - 10^7 KBE/ml) der einzelnen Bakterien stimuliert. Um direkt in den Abbildungen die Summe der Einzelwirkungen ablesen und mit der Gesamtwirkung vergleichen zu können, wurden die jeweils drei Balken, die die Zytokinmengen anzeigen, die nach Einzelstimulation mit *L. lactis* (blaue Balken), *A. Iwoffii* (rote Balken) oder *S. sciuri* (grüne Balken) gemessenen wurden, aufeinandergestapelt und direkt neben dem Balken platziert, an dem die induzierte Zytokinmenge nach korrespondierender, simultaner Stimulation abgelesen werden kann (grauer Balken). Während also die grauen Balken einen tatsächlich ermittelten Wert darstellen, geben die gestapelten Balken zwar für sich alleine genommen die tatsächlich gemessenen Werte wieder, in der Summe aber repräsentieren sie nur einen theoretischen Wert. Die resultierende Darstellung der Messdaten der IL-6-Freisetzung nach Einzel- vs. simultaner Simulation humaner DCs mit *L. lactis*, *A. Iwoffii* und *S. sciuri* ist in Abb.18 zu sehen. Da die Auswirkungen einer Stimulation humaner DCs mit jeweils einem der drei Bakterien bereits hinreichend beschrieben worden sind, liegt der Fokus im Folgenden auf den Ergebnissen, die durch simultane Stimulation induziert wurden, insbesondere im Vergleich zu der theoretischen Summe der Effekte, die auf den entsprechenden Einzelstimulationen beruhen. Der theoretische Balken, der sich als Summe aus den jeweils drei gestapelten Balken ergibt, wird fortan als „Additionsbalken“ (dreifarbiger Balken) bezeichnet, die jeweils acht Balken, die die Freisetzung nach Stimulation mit gleichbleibender Konzentration eines der Bakterien (und gleichzeitiger

Ergebnisse

Erhöhung der Konzentration der anderen zwei) anzeigen, werden als „Gruppe“ oder „Block“ bezeichnet.

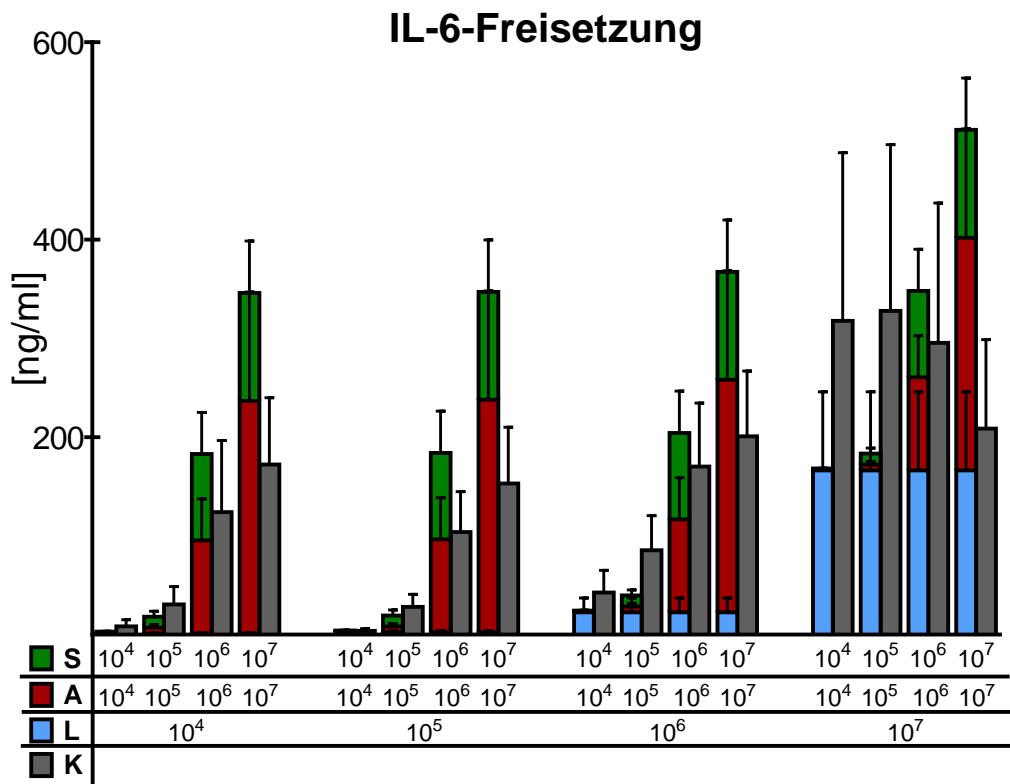


Abb.18:Freisetzung von IL-6 aus humanen DCs nach Einzel- oder simultaner Stimulation mit *L. lactis*, *A. lwoffii* und *S. sciuri*

Humane DCs wurden entweder mit nur einem Bakterium (farbige, aufeinandergestapelte Balken; grüne Balken: *S. sciuri*, rote Balken: *A. lwoffii*, blaue Balken: *L. lactis*; die Konzentration ist jeweils unter dem Balken in KBE/ml angegeben) oder mit einem Gemisch der drei Bakterien (graue Balken, Konzentration ergibt sich aus der Summe der Konzentrationen der Einzelstimulationen in KBE/ml) inkubiert. Nach 20 h wurden die Überstände gewonnen und der Zytokingehalt mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler von n = 5 Spendern.

A, *Acinetobacter lwoffii* F78; K, Kombination; L, *Lactococcus lactis* G121; S, *Staphylococcus sciuri* W620

Bei Betrachtung der IL-6-Freisetzung (Abb.18) nach simultaner Stimulation (graue Balken) lassen sich mit Ausnahme der Stimulationen, die 10⁷ KBE/ml *L. lactis* enthalten (ganz rechter Block), eindeutige konzentrationsabhängige Steigerungen der Zytokinfreisetzung erkennen. So nimmt die detektierbare IL-6-Menge innerhalb eines jeden Blockes, also mit steigender *A. lwoffii*- und *S. sciuri*-Konzentration, zu und auch die Erhöhung der *L. lactis*-Konzentration in den Gemischen führt zu einer Erhöhung der IL-6-Freisetzung, beispielsweise ist die detektierte IL-6-Menge nach Stimulation mit dem Gemisch, das 10⁷ KBE/ml *A. lwoffii* und *S. sciuri* und 10⁶ KBE/ml *L. lactis* enthielt, größer als die, die durch Verwendung von 10⁷ KBE/ml *A. lwoffii* und *S. sciuri* zusammen mit nur 10⁵ KBE/ml *L. lactis* induziert wurde. Die maximale,

Ergebnisse

durch simultane Stimulation induzierbare IL-6-Freisetzung wird durch die Kombinationen erreicht, die 10^7 KBE/ml *L. lactis* enthalten. Schon in Kombination mit 10^4 KBE/ml der anderen zwei Bakterien kann ein Zytokingehalt gemessen werden, der im Mittel deutlich über dem höchsten des vorherigen Blocks liegt ($10^7+10^7+10^6$ KBE/ml). Eine weitere Steigerung kann aber nicht erreicht werden, die freigesetzte IL-6-Menge ist auch nach Stimulationen mit höheren Konzentrationen von *A. Iwoffii* und *S. sciuri* etwa gleich hoch, beziehungsweise sinkt durch Stimulation mit 10^7 KBE/ml jeden Bakteriums wieder auf ein Niveau, das dem der $10^7+10^7+10^6$ KBE/ml-Stimulation entspricht.

Vergleicht man die sezernierten IL-6-Mengen nach simultaner Stimulation (graue Balken) mit denen, die durch rein additive Induktion sezerniert hätten werden können (dreifarbiges Additionsbalken), so lassen sich eindeutig synergistische Effekte in Bezug auf die IL-6-Freisetzung erkennen. Dies gilt für Stimulationen, die 10^7 KBE/ml *L. lactis* in Kombination mit 10^4 oder 10^5 KBE/ml *A. Iwoffii* und *S. sciuri* enthalten. In Kombination mit niedrigen *L. lactis*-Konzentrationen hingegen führen niedrige Konzentrationen von *A. Iwoffii* und *S. sciuri* zu einer IL-6-Sezernierung, die der durch die jeweiligen Additionsbalken angezeigten in etwa entspricht. Alle Stimulationsgemische, die 10^6 KBE/ml *A. Iwoffii* und *S. sciuri* enthalten, bewirken im Zusammenspiel mit niedrigen *L. lactis*-Konzentrationen eine Freisetzung, die jeweils in etwa der entspricht, die auch durch alleinige Stimulation mit *A. Iwoffii* in der entsprechenden Menge hervorgerufen wird. Höhere Konzentrationen von *L. lactis* in Verbindung mit 10^6 KBE/ml der anderen zwei Isolate führen zu IL-6-Mengen, die jeweils etwas geringer sind, als die Netto-Summen, die einer rein additiven Freisetzung entsprechen würden. Alle simultanen Stimulationen, bei denen die höchsten Konzentrationen von *A. Iwoffii* und *S. sciuri* verwendet wurden (10^7 KBE/ml), führen im Vergleich zu den entsprechenden Einzelstimulationen zu einer deutlichen Reduktion des detektierbaren IL-6-Gehalts im Überstand. So liegen die ermittelten IL-6-Mengen im Mittel deutlich unter denen, die durch alleinige Stimulation mit *A. Iwoffii*, in diesem Kontext dem stärksten Induktor, in der entsprechenden Konzentration bewirkt wurden.

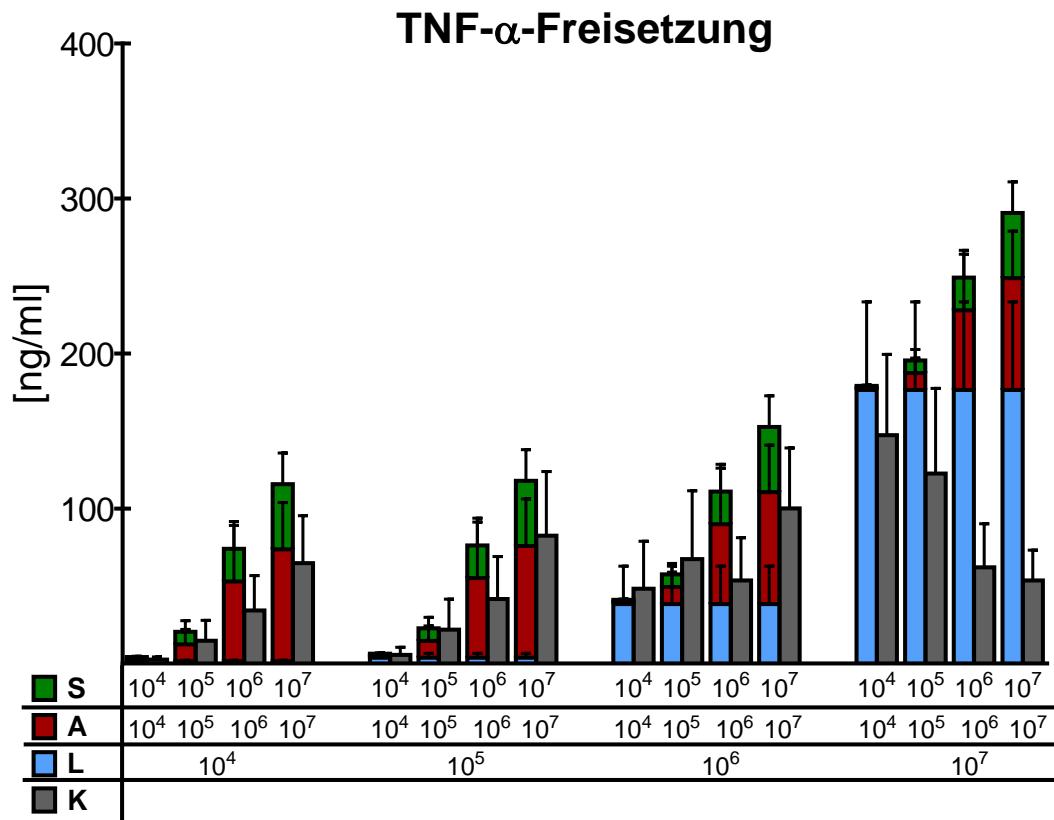


Abb.19: Freisetzung von TNF- α aus humanen DCs nach Einzel- oder simultaner Stimulation mit *L. lactis*, *A. Iwoffii* und *S. sciuri*

Humane DCs wurden entweder mit nur einem Bakterium (farbige, aufeinandergestapelte Balken; grüne Balken: *S. sciuri*, rote Balken: *A. Iwoffii*, blaue Balken: *L. lactis*; die Konzentration ist jeweils unter dem Balken in KBE/ml angegeben) oder mit einem Gemisch der drei Bakterien (graue Balken, Konzentration ergibt sich aus der Summe der Konzentrationen der Einzelstimulationen in KBE/ml) inkubiert. Nach 20 h wurden die Überstände gewonnen und der Zytokingehalt mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler von n=5 Spendern.

A, *Acinetobacter Iwoffii* F78; K, Kombination; L, *Lactococcus lactis* G121; S, *Staphylococcus sciuri* W620

Ein ähnliches Bild ergibt sich bei der Betrachtung der TNF- α -Freisetzung nach simultaner beziehungsweise alleiniger Stimulation humaner DCs mit *L. lactis*, *A. Iwoffii* und *S. sciuri* (Abb.19). Auch hier lässt sich eine konzentrationsabhängige Steigerung der Zytokinfreisetzung sowohl durch Erhöhung der *A. Iwoffii*- und *S. sciuri*- als auch der *L. lactis*-Konzentration erkennen, mit Ausnahme der Stimulationen, die 10⁷ KBE/ml *L. lactis* enthalten (ganz rechter Block). Die maximale, durch simultane Stimulation induzierte TNF- α -Freisetzung lässt sich nach Stimulation der DCs mit 10⁴ KBE/ml *A. Iwoffii* und *S. sciuri* in Verbindung mit 10⁷ KBE/ml *L. lactis* detektieren, eine weitere Erhöhung der *A. Iwoffii*- und *S. sciuri*-Konzentrationen führt zu einer Abnahme der Zytokininduktion, die Zytokinmenge, die nach Inkubation mit je 10⁷ KBE/ml aller drei Bakterien gemessen wurde, liegt in etwa auf

Ergebnisse

dem Niveau, welches bereits durch die gleichen Konzentrationen von *A. Iwoffii* und *S. sciuri* in Kombination mit nur 10^4 KBE/ml des *Llactis* bewirkt wurde.

Es lassen sich keine Hinweise auf eine synergistische Freisetzung von TNF- α nach simultaner Stimulation mit *A. Iwoffii*, *S. sciuri* und *L. lactis* finden. Im Gegenteil, mit einigen Ausnahmen ist die nach simultaner Stimulation detektierte Zytokinmenge oft deutlich geringer als die, die durch rein additive Induktion freigesetzt worden wäre (grauer Balken vs. dreifarbig Balken). Oftmals ist diese Menge sogar deutlich geringer als diejenige, die nach Einzelstimulation mit dem jeweils stärksten Induktor, der in der Kombination enthalten war, gemessen werden konnte. Dieser Effekt ist besonders deutlich nach Stimulationen mit Gemischen, die 10^7 KBE/ml *L. lactis* enthielten, ausgeprägt: die nach Inkubation der DCs mit je 10^7 KBE/ml aller drei Bakterien detektierte TNF- α -Menge z.B. entspricht nur etwa einem Drittel der Menge, die bereits durch eine Stimulation mit 10^7 KBE/ml *L. lactis* alleine sezerniert wurde. Ausnahmen bezüglich dieser Beobachtungen stellen die simultanen Stimulationen mit 10^6 KBE/ml *L. lactis* dar (dritter Block). Zusammen mit niedrigen Konzentrationen der andern zwei Bakterien (10^4 und 10^5 KBE/ml) wird die Freisetzung von TNF- α additiv induziert, eine simultane Stimulation in Kombination mit höheren *A. Iwoffii*- und *S. sciuri*-Konzentrationen führt zu Zytokinmengen, die immer noch deutlich über den höchsten, nach Einzelstimulation gemessenen Werten liegen.

Auch die Freisetzung des immunregulatorischen IL-10 aus DCs nach alleiniger und simultaner Stimulation mit *L. lactis*, *A. Iwoffii* und *S. sciuri* wurde mittels ELISA untersucht (Abb.20). In Bezug auf dieses Zytokin lassen sich die deutlichsten Konzentrationsabhängigkeiten erkennen. Sowohl eine Erhöhung der *A. Iwoffii*- und *S. sciuri*- als auch der *L. lactis*-Konzentration führt zu einem Anstieg der messbaren IL-10-Menge. Die maximale, durch simultane Stimulation induzierte Zytokinmenge wird durch die Kombination *A. Iwoffii* und *S. sciuri* 10^7 KBE/ml mit *L. lactis* 10^6 KBE/ml erreicht. Die weitere Erhöhung der *L. lactis*-Konzentration auf 10^7 KBE/ml (ganz rechter Block) führt zwar in Verbindung mit den Konzentrationen 10^4 - 10^6 KBE/ml der anderen zwei Spezies im Vergleich zu den entsprechenden Kombinationen des *L. lactis* 10^6 KBE/ml-Blockes (dritter Block) zu einem Anstieg der Zytokinmengen, durch Kombination mit 10^7 KBE/ml *A. Iwoffii* und *S. sciuri* aber wird eine Zytokinmenge sezerniert, die etwas niedriger ist, als die entsprechende Menge, die mit 10^6 KBE/ml *L. lactis* im Mix induziert wurde und ist vergleichbar mit der, die nach

Ergebnisse

Stimulation mit 10^7 KBE/ml *A. Iwoffii* und *S. sciuri* in Kombination mit nur 10^4 oder 10^5 KBE/ml *L. lactis* gemessen werden konnte.

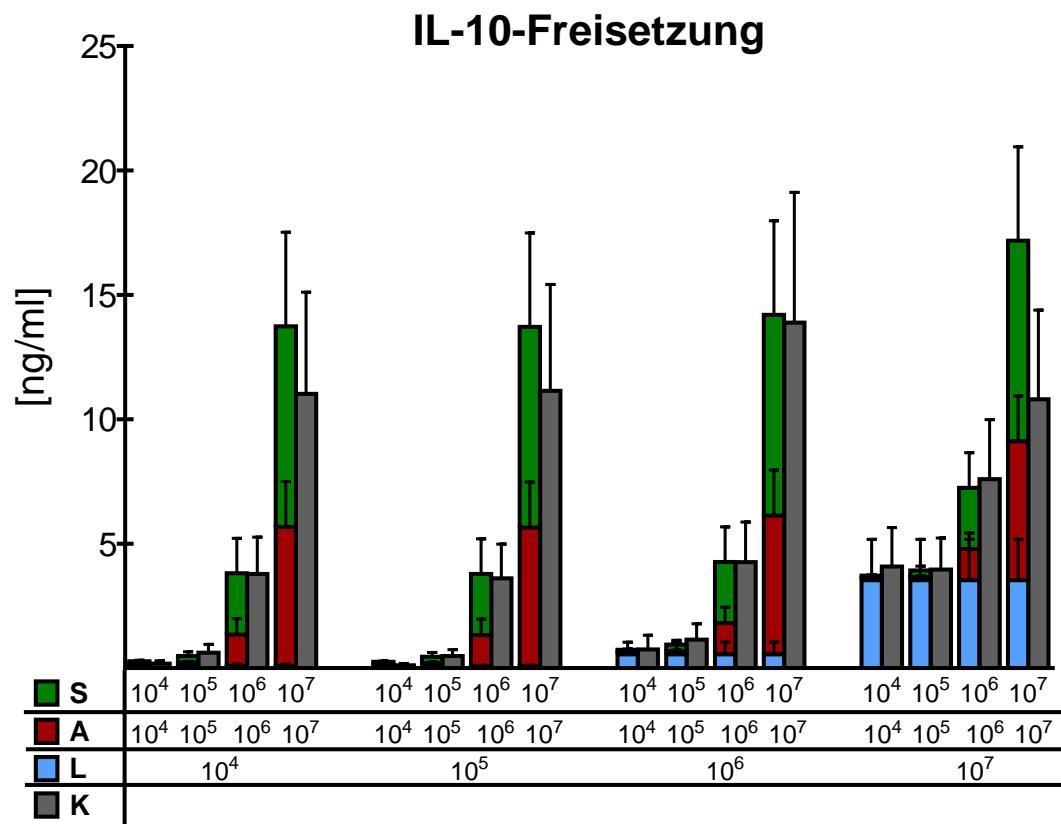


Abb.20:Freisetzung von IL-10 aus humanen DCs nach Einzel-oder simultaner Stimulation mit *L. lactis*, *A. Iwoffii* und *S. sciuri*

Humane DCs wurden entweder mit nur einem Bakterium (farbige, aufeinandergestapelte Balken, Konzentration jeweils unter Humane DCs wurden entweder mit nur einem Bakterium (farbige, aufeinandergestapelte Balken; grüne Balken: *S. sciuri*, rote Balken: *A. Iwoffii*, blaue Balken: *L. lactis*; die Konzentration ist jeweils unter dem Balken in KBE/ml angegeben) oder mit einem Gemisch der drei Bakterien (graue Balken, Konzentration ergibt sich aus der Summe der Konzentrationen der Einzelstimulationen in KBE/ml) inkubiert. Nach 20 h wurden die Überstände gewonnen und der Zytokingehalt mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler von n = 5 Spendern.

A, *Acinetobacter Iwoffii* F78; **K**, Kombination; **L**, *Lactococcus lactis* G121; **S**, *Staphylococcus sciuri* W620

Durch fast alle Kombinationen der drei Bakterien wird eine IL-10-Freisetzung induziert, die jeweils in etwa der entspricht, die durch rein additive Effekte induziert werden würde. Ausnahmen bilden hierbei jeweils die Kombinationen, welche die höchsten Konzentrationen von *A. Iwoffii* und *S. sciuri* beinhalten (jeweils äußerer, rechter, grauer Balken eines jeden Blockes): hier ist die Zytokinmenge jeweils etwas geringer, als die, die durch rein additive Freisetzung induziert werden könnte. Diese Beobachtung gilt allerdings nicht für den Mix, der 10^6 KBE/ml *L. lactis* enthält (dritter Block), da dieser ebenfalls eine additive IL-10-Freisetzung bewirkt. Es lassen sich also keine synergistischen Effekte beobachten,

Ergebnisse

stattdessen wurde durch fast alle getesteten Bakteriengemische stets eine additive IL-10-Sekretion induziert.

Hinsichtlich der ermittelten IL-12p70-Sezernierung nach simultaner vs. alleiniger Stimulation mit *A. Iwoffii*, *S. sciuri* und *L. lactis* lässt sich teilweise eine inverse Beziehung zwischen bakterieller Konzentration und freigesetzter IL-12p70-Menge erkennen (Abb.21).

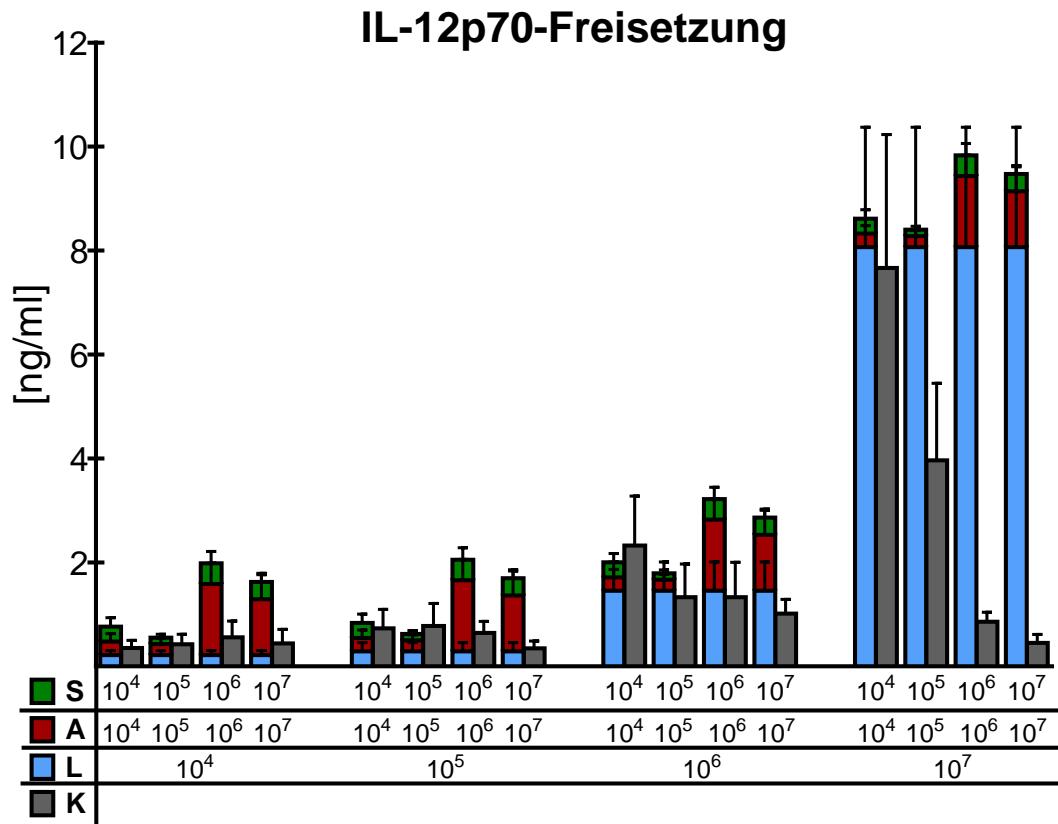


Abb.21: Freisetzung von IL-12 aus humanen DCs nach Einzel-oder simultaner Stimulation mit *L. lactis*, *A. Iwoffii* und *S. sciuri*

Humane DCs wurden entweder mit nur einem Bakterium (farbige, aufeinander gestapelte Balken; grüne Balken: *S. sciuri*, rote Balken: *A. Iwoffii*, blaue Balken: *L. lactis*; die Konzentration ist jeweils unter dem Balken in KBE/ml angegeben) oder mit einem Gemisch der drei Bakterien (graue Balken, Konzentration ergibt sich aus der Summe der Konzentrationen der Einzelstimulationen in KBE/ml) inkubiert. Nach 20 h wurden die Überstände gewonnen und der Zytokingehalt mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler von n = 5 Spendern.

A, *Acinetobacter Iwoffii* F78; K, Kombination; L, *Lactococcus lactis* G121; S, *Staphylococcus sciuri* W620

Zwar induzieren die Kombinationen mit den höheren Konzentrationen von *L. lactis* im Vergleich auch jeweils eine stärkere Freisetzung (steigen also von Block zu Block), die Erhöhung der *A. Iwoffii*- und *S. sciuri*-Konzentrationen bei gleichbleibender *L. lactis*-Konzentration aber führt jeweils zu einer Abnahme der detektierbaren Zytokinmenge (nehmen also innerhalb eines Blockes ab). Die größte IL-12p70-Menge nach simultaner Stimulation wird folglich durch Kombination von 10⁴ KBE/ml *A. Iwoffii* und *S. sciuri* mit 10⁷ KBE/ml *L. lactis* induziert. Generell bewirken alle Behandlungen der DCs mit Gemischen, die

Ergebnisse

niedrige Konzentrationen von *A. Iwoffii* und *S. sciuri* enthalten eine IL-12p70-Freisetzung, die in etwa das Niveau erreicht, das durch additive Freisetzung induziert werden könnte. Höhere Konzentrationen von *A. Iwoffii* und *S. sciuri* führen zu einer stark verminderten Sezernierung von IL-12p70, meist wird nur eine Menge freigesetzt, die auch in etwa durch alleinige Stimulation mit *A. Iwoffii* oder *S. sciuri*, die beide generell nur eine geringe IL-12p70-Freisetzung bewirken, in der entsprechenden Konzentration induziert wird. Dieser Effekt wird besonders in Verbindung mit hohen *L. lactis*-Konzentrationen deutlich. So entsprechen die gemessenen IL-12p70-Mengen nach Stimulation humaner DCs mit einem Mix aus 10^7 KBE/ml *L. lactis* und 10^6 oder 10^7 KBE/ml *A. Iwoffii* und *S. sciuri* nur etwa einem Zehntel derer, die nach Einzelstimulation mit 10^7 KBE/ml des *L. lactis*, dem stärksten IL-12p70-Induktor, detektiert werden konnten, beziehungsweise gerade einmal der Menge, die durch alleinige Stimulation mit dem schwächsten IL-12p70-Induktor (*S. sciuri*) erreicht wird.

Bisher wurden nur die Daten gezeigt, die auf Verwendung von Stimulationsgemische basieren, in denen die Konzentrationen von *A. Iwoffii* und *S. sciuri* jeweils identisch waren und die Konzentrationen des *L. lactis* entsprechend variiert wurden. Diese Versuche wurden auch mit Kombinationen durchgeführt, bei denen entweder identische Konzentrationen von *A. Iwoffii* und *L. lactis* oder *S. sciuri* und *L. lactis* mit verschiedenen Konzentrationen des jeweils dritten Bakteriums durchgeführt wurden. Diese Daten können im Anhang eingesehen (siehe Anhang, ab S. 133) werden. Zudem werden die Ergebnisse aller drei Datensätze bezüglich der Freisetzung jeweils eines Zytokins im Folgenden zusammengefasst:

Enthielt das Bakteriengemisch zwei Bakterien in niedrigen Konzentrationen (10^4 oder 10^5 KBE/ml), bewirkt eine Stimulation mit diesem unabhängig von der Konzentration des dritten Bakteriums stets eine additive **IL-6**-Freisetzung (Abb.38, S.133). Ausnahmen diesbezüglich stellen die Kombination von 10^4 oder 10^5 KBE/ml *A. Iwoffii* und *S. sciuri* in Verbindung mit 10^6 oder 10^7 KBE/ml *L. lactis* und *L. lactis* und *S. sciuri* in 10^5 KBE/ml + 10^6 KBE/ml *A. Iwoffii* dar, da sie eindeutig zu einer synergistischen IL-6-Freisetzung führen. Wurden zwei der drei Bakterien in einer Konzentration von 10^6 KBE/ml verwendet, liegen die detektierten Zytokinmengen größtenteils auf einem etwas niedrigerem Niveau, als das, welches einer rein additiven Induktion entsprechen würde, die Mengen sind aber stets größer als die, die durch eines der Bakterien in entsprechender Konzentration alleine induziert werden. Dies trifft allerdings nicht auf die Kombination *S. sciuri* und *L. lactis* 10^6 KBE/ml + *A. Iwoffii* 10^4 KBE/ml

Ergebnisse

zu, denn auch hier lässt sich ein synergistischer Effekt auf die IL-6-Sezernierung erkennen. Die Stimulationen mit Kombinationen, in denen zwei Bakterien in der höchsten, getesteten Konzentration (10^7 KBE/ml) verwendet wurden, führte unabhängig von der Konzentration des dritten Bakteriums stets zu Zytokinmengen, die geringer waren, als die, die durch alleinige Stimulation mit dem jeweils stärksten Induktor des Gemisches bewirkt wurden, jedoch höher waren als die, welche durch Einzelstimulation mit dem jeweils schwächsten Induktor freigesetzt wurden.

Die Effekte einer Stimulation humaner DCs mit verschiedenen Kombinationen von *A. Iwoffii*, *S. sciuri* und *L. lactis* auf die **TNF- α** -Freisetzung (Abb.39, S.134) sind äußerst vielfältig, lassen sich aber wie folgt zusammenfassen: Befanden sich von zwei der Bakterien 10^4 oder 10^5 KBE/ml in dem Stimulationsgemisch, so entspricht die resultierende Zytokinmenge einer additiven Freisetzung, wenn das dritte Bakterium wie folgt konzentriert war:

A. Iwoffii: bis zu einer Konzentration von 10^5 KBE/ml

L. lactis: bis zu einer Konzentration von 10^6 KBE/ml

S. sciuri: bis zu einer Konzentration von 10^7 KBE/ml.

Die Kombination höherer Konzentrationen der Isolate führt zur Sezernierung von **TNF- α** -Mengen, die zwischen denen liegt, die durch alleinige Stimulation mit dem jeweils stärksten und schwächsten **TNF- α** -induzierenden Bakterium erreicht werden können. Es fällt auf, dass, sobald eine der Komponenten in einer höheren Konzentration als 10^5 KBE/ml verwendet wurde, ein Zytokinniveau erreicht wird, welches auch durch eine weitere Erhöhung der bakteriellen Konzentration nicht deutlich überschritten wird: so liegen alle **TNF- α** -Mengen, die nach Stimulation mit mindestens $2 \times 10^4 + 1 \times 10^5$ KBE/ml Gesamtbakterienkonzentration gemessen wurden, auf etwa gleicher Höhe. Diese Beobachtung gilt aber nur für Stimulationen, bei denen die Konzentration von *A. Iwoffii* oder *S. sciuri* variiert wurden, während die anderen zwei Stimuli in jeweils gleicher Konzentration verwendet wurden (Abb.39, S.134). Die Daten, die durch Stimulation humaner DCs mit variierenden *L. lactis*-Konzentrationen entstanden sind, wurden bereits besprochen (vgl. Abb.19, S.63) und weisen diese Tendenzen nicht auf.

Das Bild der durch simultane Stimulation induzierten **IL-10**-Freisetzung hingegen ist sehr eindeutig: Mit Ausnahme der Kombinationen, die 10^7 KBE/ml von mindestens zwei der Bakterien enthalten, führen alle anderen verwendeten Gemische zu einer additiven IL-10-Freisetzung (Abb.40, S.135).

Ergebnisse

Die drei Datensätze der **IL-12p70**-Messungen unterscheiden sich sehr stark voneinander, weshalb die zwei nicht gezeigten Abbildungen an dieser Stelle einzeln zusammengefasst werden. Die Effekte, die sich durch Stimulationen mit Kombinationen, in denen *L. lactis* und *S. sciuri* jeweils in gleichen Konzentrationen eingesetzt wurden (Abb. 41, S.136), ergeben, sind äußerst divers und lassen keine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit erkennen. Grundsätzlich wird durch keines der getesteten Gemische eine additive, geschweige denn synergistisch IL-12p70-Freisetzung erreicht. Nach Stimulationen mit Kombinationen, die 10^6 oder 10^7 KBE/ml *A. Iwoffii* enthielten, lassen sich tendenziell etwas höhere IL-12p70-Mengen nachweisen als wenn *A. Iwoffii* in 10^4 oder 10^5 KBE/ml vorlag. Innerhalb eines Datenblockes (also bei gleichbleibender *A. Iwoffii*-Konzentration und variierender *L. lactis*- und *S. sciuri*-Konzentration) nimmt die gemessene IL-12p70-Menge mit steigender *L. lactis* und *S. sciuri*-Konzentration bis 10^6 KBE/ml leicht zu und liegt nach Verwendung von 10^7 KBE/ml wieder auf etwa dem Niveau, welches auch durch die Kombination, die je 10^4 KBE/ml dieser zwei Bakterien in diesem Block enthielt, induziert wird.

In Bezug auf die Effekte, die sich durch Behandlung der DCs mit Gemischen ergaben, bei denen die Konzentrationen von *L. lactis* und *A. Iwoffii* gleich waren (Abb. 41, S.136), lassen sich deutlichere Muster erkennen. Innerhalb eines Blockes steigen die freigesetzten IL-12p70-Mengen mit steigender Konzentration von *L. lactis* und *A. Iwoffii* bis zu einer Konzentration von 10^6 KBE/ml an, nach Verwendung von 10^7 KBE/ml ist das Zytokinniveau wieder deutlich geringer. Die Erhöhung der *S. sciuri*-Konzentration wirkt sich bis einschließlich 10^6 KBE/ml nur minimal steigernd auf die IL-12p70-Sekretion aus (beispielsweise wurden durch Stimulation mit je 1×10^6 KBE/ml *L. lactis* und *A. Iwoffii* in Kombination mit 10^4 , 10^5 oder 10^6 KBE/ml *S. sciuri* jeweils nahezu identische Zytokinmengen induziert). Nach Behandlung der DCs mit Gemischen, die 10^7 KBE/ml *S. sciuri* enthielten, lässt sich aber eine deutliche Erhöhung der IL-12p70-Mengen im Vergleich zu den entsprechenden Kombinationen mit geringerer *S. sciuri*-Konzentration feststellen.

3.4 Analyse der Effekte, die durch simultane Stimulation humaner DCs mit fünf Kuhstallbakterien induziert werden

3.4.1 Freisetzung von Schlüsselzytokinen

Diese ersten Analysen der Zytokinfreisetzung nach Stimulation humaner DCs machen deutlich, dass eine Kombination von *L. lactis*, *A. Iwoffii* und *S. sciuri* nur selten zu synergistischen Effekten führt. Vielmehr lassen sie vermuten, dass eine simultane Stimulation im Vergleich zu Einzelstimulationen nicht nur eine andere Art/Stärke der Aktivierung humaner DCs bewirkt (veränderte Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF-α anhand welcher oft auch die Aktivierung humaner DCs bemessen wird), sondern auch zu einer veränderten T-Zellpolarisierungskapazität der DCs führen kann (veränderte IL-10- und IL-12p70-Freisetzung). Aus diesem Grunde wurden die beiden ebenfalls allergieprotektiven Kuhstallbakterien *Jeotgalicoccus psychrophilus* W713 (*J. psychro.*) und *Lactobacillus curvatus* (*Lb. curvatus*), deren grundlegenden immunmodulatorischen Eigenschaften in dieser Arbeit untersucht und bereits gezeigt wurden (siehe 3.1, S.40), mit in das Gemisch für die simultane Stimulation humaner DCs aufgenommen und zunächst erneut die Freisetzung der vier Zytokine IL-6, TNF-α, IL-10 und IL-12p70 analysiert.

Auch hier galt es anfangs, die Summe der Einzelwirkungen direkt mit der Gesamtwirkung vergleichen zu können, weshalb sich auch hier der Darstellung der Zytokinfreisetzung mittels Additionsbalken bedient wurde (fünffarbige Balken). Um die Anzahl auszutestender Stimulationsgemische zu reduzieren, wurden nur Kombinationen verwendet, in denen von allen fünf Bakterien die gleiche Konzentration enthalten war. Um die Gesamtbakterienlast pro Zelle berücksichtigen zu können, wurden von allen Kombinationen zwei verschiedene Konzentrationen für die DC-Stimulationen verwendet: zum einen 1×10^8 KBE/ml, die sich aus $0,2 \times 10^8$ KBE/ml je Bakterium zusammensetzen (gestreifte graue Balken), und 5×10^8 KBE/ml, die sich aus 1×10^8 KBE/ml je Bakterium zusammensetzen (graue Balken). De facto bedeutet dies, dass die Gesamtbakterienmenge der Kombinationen entweder den entsprechenden Konzentrationen der Einzelstimulationen (gestreifter grauer Balken vs. farbiger Balken) oder der Summe aller zur Einzelstimulation verwendeten Konzentrationen (grauer Balken vs. fünffarbiger Additionsbalken) entspricht. Die aus diesen Anforderungen hervorgehende Darstellungsweise der Zytokinfreisetzung nach alleiniger vs. simultaner Stimulation lässt sich

Ergebnisse

z.B. an Abb.22, welche die Freisetzung von IL-6 nach Stimulation humaner DCs illustriert, erkennen.

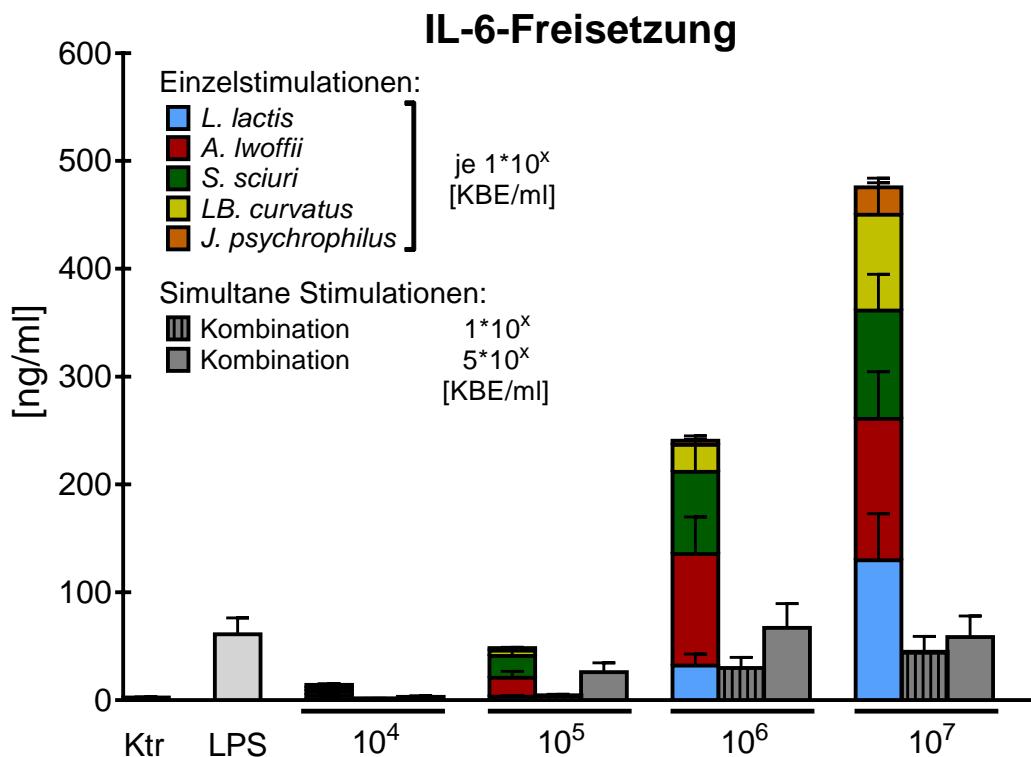


Abb.22:Freisetzung von IL-6 aus humanen DCs nach Einzel-oder simultaner Stimulation mit *L. lactis*, *A. Iwoffii*, *S. sciuri*, *Lb. curvatus* und *J. psychrophilus*

Humane DCs wurden entweder mit nur einem der angegebenen Bakterien (farbige Balken), einem Gemisch der fünf Bakterien (graue Balken), Medium (Ktr, weißer Balken) oder 100 ng/ml LPS (LPS, hellgrauer Balken) inkubiert. Nach 20 h wurden die Überstände gewonnen und der Zytokingehalt mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler von n = 6 Spendern.

Die durch simultane Stimulation mit *L. lactis*, *A. Iwoffii*, *S. sciuri*, *Lb. curvatus* und *J. psychrophilus* induzierte IL-6-Freisetzung (graue Balken, mit und ohne Streifen) zeigt eine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit. Erst nach Inkubation der DCs mit $5 \cdot 10^5$ KBE/ml (grauer Balken) werden IL-6-Mengen freigesetzt, die über denen der nicht stimulierten DCs liegen (Ktr). Während die Verdopplung der bakteriellen Konzentration auf $1 \cdot 10^6$ KBE/ml (grauer, gestreifter Balken) sich kaum auf die freigesetzte Zytokinmenge auswirkt, bewirkt die Erhöhung auf $5 \cdot 10^6$ KBE/ml (grauer Balken) im Mittel eine mehr als doppelt so hohe IL-6-Auschüttung. Diese stellt auch die maximal durch simultane Stimulation erreichbare IL-6-Menge dar, nach Stimulation mit den beiden höher konzentrierten Gemischen ($1 \cdot 10^7$ und $5 \cdot 10^7$ KBE/ml) werden IL-6-Mengen detektiert, die im Mittel etwas unter diesem Maximum liegen, aber höher sind als die durch $1 \cdot 10^6$ KBE/ml induzierten. Beim Vergleich der gemessenen IL-6-Mengen nach simultaner Stimulation (graue Balken, mit und ohne Streifen)

Ergebnisse

mit denen, die durch die Additionsbalken angezeigt werden (fünffarbige Balken), wird ersichtlich, dass die Kombination der fünf Bakterien weder zu einer synergistischen, noch zu einer additiven IL-6-Freisetzung führt. Vielmehr wird durch die Stimulation mit 5×10^5 KBE/ml eine IL-6-Induktion bewirkt, die in etwa auf dem Niveau liegt, das auch nach Einzelstimulation mit dem stärksten IL-6-Induktor in dieser Konzentration (*S. sciuri*) freigesetzt wurde. Alle anderen Kombinationen führen zur Freisetzung von IL-6-Mengen, die deutlich geringer sind als diejenigen, die durch alleinige Stimulation mit dem jeweils stärksten IL-6-induzierendem Bakterium freigesetzt wurden. Beispielsweise führt die Behandlung humaner DCs mit einer Mischung der fünf Bakterien in einer Gesamtkonzentration von 1×10^7 KBE/ml (grauer Balken mit Streifen) zu einer IL-6-Sezernierung, die in etwa ein Drittel derer ausmacht, die nach alleiniger Stimulation mit der gleichen *L. lactis*-Konzentration gemessen werden kann (blauer Balken).

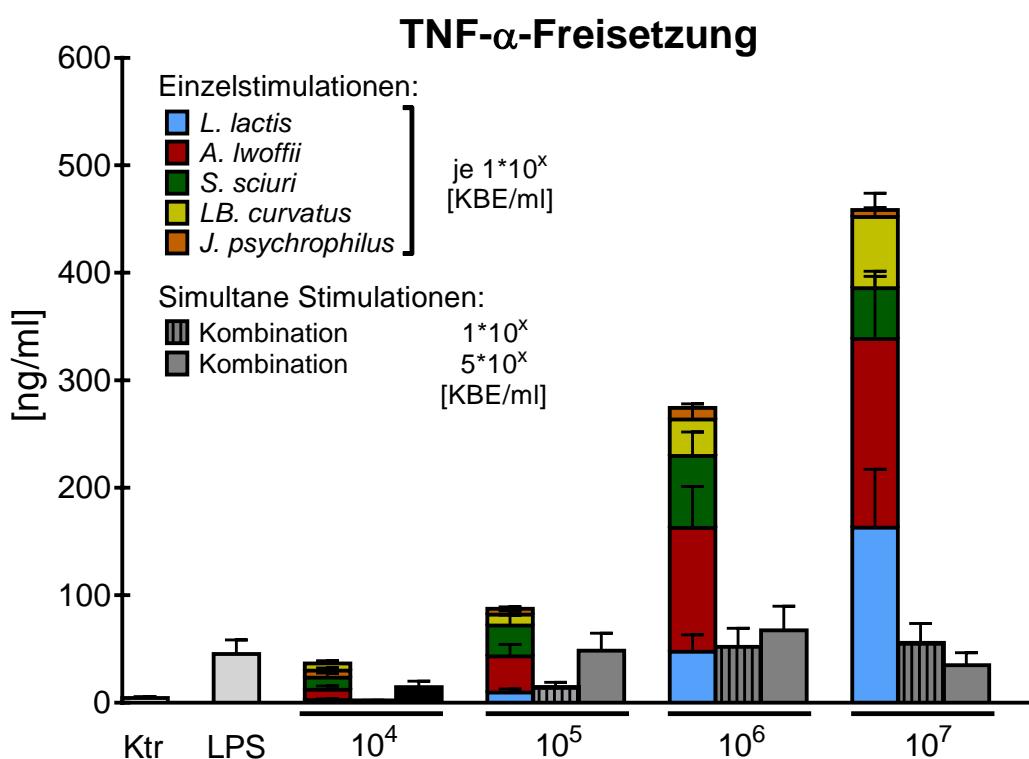


Abb.23:Freisetzung von TNF- α aus humanen DCs nach Einzel-oder simultaner Stimulation mit *L. lactis*, *A. Iwoffii*, *S. sciuri*, *LB. curvatus* und *J. psychrophilus*

Humane DCs wurden entweder mit nur einem der angegebenen Bakterien (farbige Balken), einem Gemisch der fünf Bakterien (graue Balken), Medium (Ktr, weißer Balken) oder 100 ng/ml LPS (LPS, hellgrauer Balken) inkubiert. Nach 20 h wurden die Überstände gewonnen und der Zytokingehalt mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler von $n = 6$ Spendern.

Ergebnisse

Die Daten der TNF- α -Freisetzung (Abb.23) zeigen ein ähnliches Bild wie die IL-6-Daten: Zwar werden hier nur 5×10^4 KBE/ml des Bakteriengemisches benötigt, um eine Ausschüttung zu bewirken, die stärker ist als die der reinen Mediumbehandlung (IL-6: 5×10^5 KBE/ml), doch auch in diesem Kontext führt die weitere Erhöhung der Stimulationskonzentration zur Zunahme der gemessenen TNF- α -Freisetzung, bis die maximale Induktion durch Stimulation mit 5×10^6 KBE/ml erreicht wird und das Zytokinniveau durch schrittweise Erhöhung der bakteriellen Konzentration ebenfalls schrittweise absinkt. Auffällig ist, dass eine Konzentrationsverdopplung der Bakterienkombination kaum Auswirkungen auf die sezernierte TNF- α -Menge zeigt, die Verfünffachung hingegen bis zu einer Gesamtkonzentration von 5×10^6 KBE/ml meist zu einer Zunahme des detektierten Zytokingehaltes führt. So liegen die induzierten Mengen nach Stimulation mit 5×10^4 und 1×10^5 KBE/ml, 5×10^5 und 1×10^6 KBE/ml und 5×10^6 und 1×10^7 KBE/ml jeweils auf fast identischen Niveaus. Auch in Bezug auf die TNF- α -Freisetzung zeigt sich, dass die Stimulation humaner DCs mit den höher konzentrierten Kombinationen im Vergleich zu den Einzelstimulationen eine Reduzierung der TNF- α -Sekretion bewirkt. Beispielsweise ist die Menge an gemessenem TNF- α nach DC-Stimulation mit der Kombination der fünf Bakterien in einer Gesamtkonzentration von 1×10^6 KBE/ml weniger als halb so groß, wie diejenige, die nach alleiniger Stimulation mit der gleichen Menge *A. Iwoffii* ermittelt werden kann. Dennoch liegen alle durch simultane DC-Stimulation hervorgerufenen TNF- α -Mengen über dem Niveau, das nach Einzelbehandlung mit dem jeweils am geringsten aktiven Bakterium in der gleichen Konzentration gemessen wurde.

Dieser reduzierende Effekt, der durch die Stimulation mit Gemischen, die hohe Konzentrationen der einzelnen Bakterien enthalten, vermittelt wird, wird noch deutlicher bei Betrachtung der ELISA-Daten bezüglich der IL-12p70-Freisetzung (Abb.24).

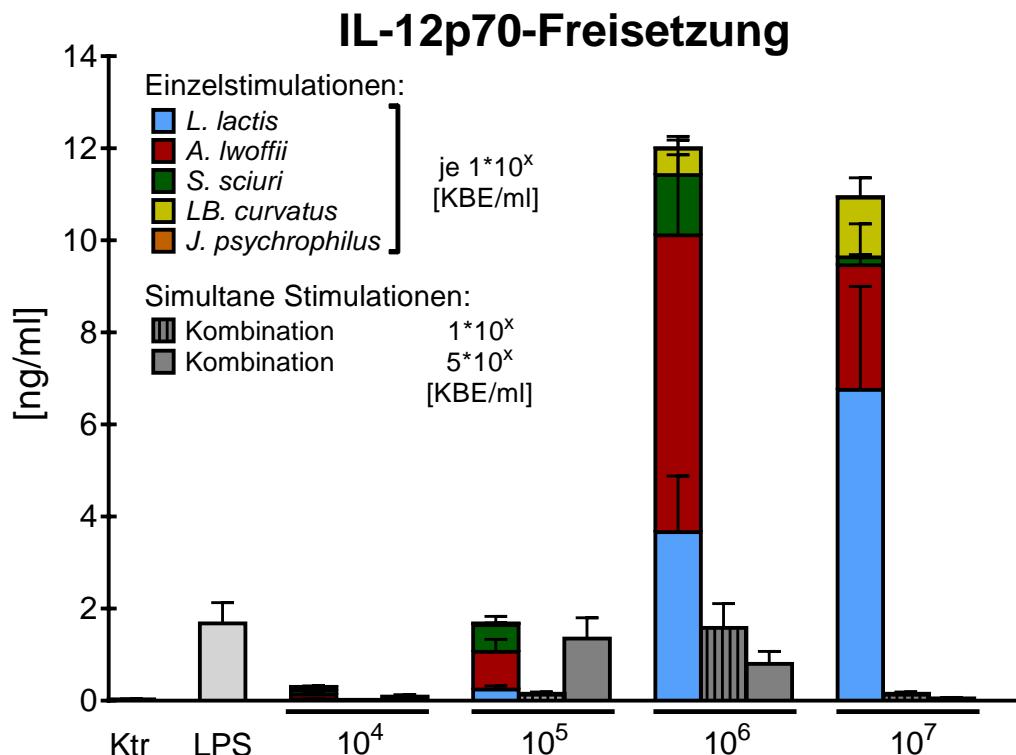


Abb.24:Freisetzung von IL-12p70 aus humanen DCs nach Einzel-oder simultaner Stimulation mit *L. lactis*, *A. Iwoffii*, *S. sciuri*, *Lb. curvatus* und *J. psychrophilus*

Humane DCs wurden entweder mit nur einem der angegebenen Bakterien (farbige Balken), einem Gemisch der fünf Bakterien (graue Balken), Medium (Ktr, weißer Balken) oder 100 ng/ml LPS (LPS, hellgrauer Balken) inkubiert. Nach 20 h wurden die Überstände gewonnen und der Zytokingehalt mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler von n = 6 Spendern.

Die simultane Stimulation humaner DCs führt erst mit einer Gesamtkonzentration von mindestens 5×10^5 KBE/ml (grauer Balken) zu einer deutlichen IL-12p70-Freisetzung. Nach Stimulation mit der doppelten Konzentration des Gemisches (1×10^6 KBE/ml, gestreifter grauer Balken) ist der gemessene IL-12p70-Gehalt im Mittel minimal höher (1,35 ng/ml vs. 1,58 ng/ml), durch die noch höher konzentrierte Stimulation (5×10^6 KBE/ml) aber verringert sich die IL-12p70-Menge wieder und liegt unter dem Niveau, das durch Stimulation mit 5×10^5 KBE/ml induziert wurde. Nach Behandlung der DCs mit den höchsten, angewandten Konzentrationen wird das Zytokin nur noch in geringsten Mengen (1×10^7 KBE/ml) oder gar nicht mehr (5×10^7 KBE/ml) freigesetzt.

Während die nach Stimulation mit 5×10^5 KBE/ml freigesetzte IL-12p70-Menge fast der einer additiven Induktion entspricht (Höhe des fünffarbigen Additionsbalkens), reicht die durch Stimulation mit 1×10^6 oder 5×10^6 KBE/ml des Bakteriengemisches sezernierte IL-12p70-Menge nicht an die durch 10^6 KBE/ml *A. Iwoffii* (roter Balken) oder *L. lactis* (blauer Balken)

Ergebnisse

induzierte heran, sondern befindet sich auf einem Niveau, das zwischen denen liegt, die durch Inkubation mit den beiden nur wenig IL-12p70-induzierenden Bakterien *S. sciuri* (grüner Balken) und *Lb. curvatus* (gelber Balken) erreicht wurden.

Die IL-10-Sezernierung, die nach simultaner Stimulation festgestellt werden konnte, ist unter Verwendung einer Gesamtbakterienlast von 5×10^4 , 5×10^5 und 1×10^6 KBE/ml vergleichbar (Abb.25, graue Balken, mit und ohne Streifen). Erst eine Erhöhung der Konzentration des Bakteriengemisches auf 5×10^6 KBE/ml (grauer Balken) führt zu einer deutlichen Steigerung der IL-10-Freisetzung. Ähnlich wie bereits für die Sezernierung von TNF- α beschrieben, führt die Stimulation mit der doppelten Gesamtbakterienlast (1×10^7 KBE/ml, gestreifter grauer Balken) nicht zu einer stärkeren Ausschüttung des Zytokins, nach Inkubation der DCs mit 5×10^7 KBE/ml (grauer Balken) aber ist ein starker Anstieg der detektierbaren IL-10-Menge zu verzeichnen. Durch diese Stimulation wird auch die maximale, durch simultane Stimulation induzierbare IL-10-Menge freigesetzt.

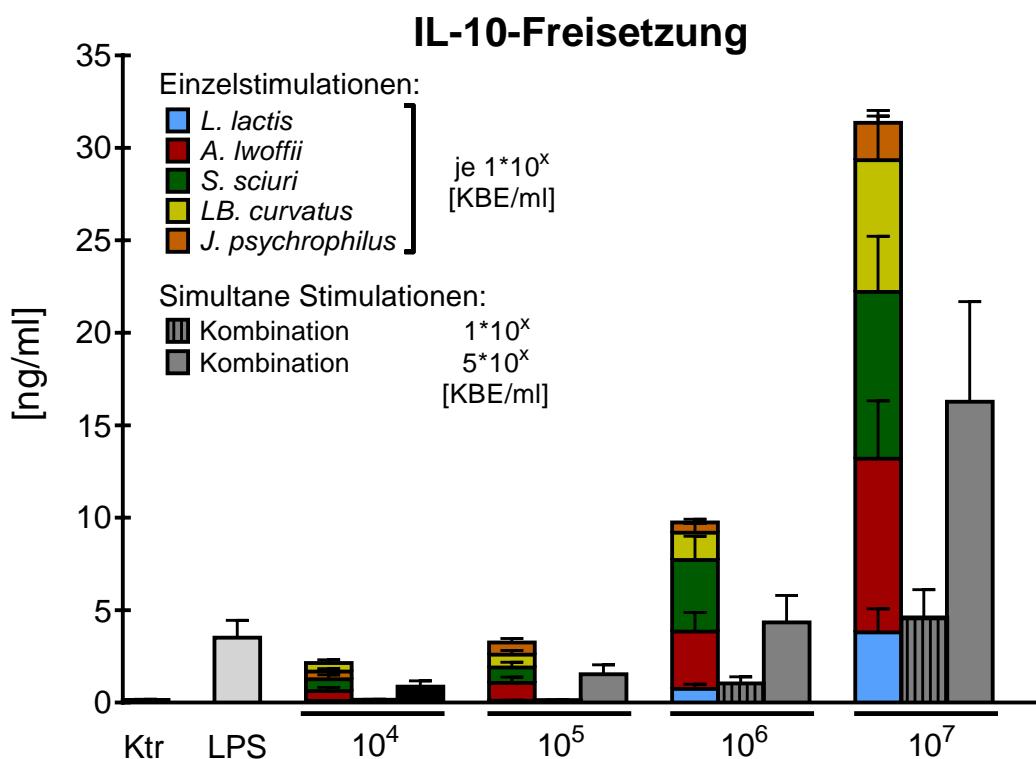


Abb.25:Freisetzung von IL-10 aus humanen DCs nach Einzel-oder simultaner Stimulation mit *L. lactis*, *A. Iwoffii*, *S. sciuri*, *Lb. curvatus* und *J. psychrophilus*

Humane DCs wurden entweder mit nur einem der angegebenen Bakterien (farbige Balken), einem Gemisch der fünf Bakterien (graue Balken), Medium (Ktr, weißer Balken) oder 100 ng/ml LPS (LPS, hellgrauer Balken) inkubiert. Nach 20 h wurden die Überstände gewonnen und der Zytokingehalt mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler von n =6 Spendern.

Ergebnisse

Auch in Bezug auf die durch simultane Stimulation induzierte IL-10-Freisetzung lassen sich weder synergistische noch additive Effekte durch Kombination von *L. lactis*, *A. Iwoffii*, *S. sciuri*, *Lb. curvatus* und *J. psychro*. bewirken. Dennoch führen die simultanen Stimulationen zumindest mit 5×10^8 KBE/ml stets zu IL-10-Mengen, die immer mindestens auf dem Niveau liegen, welches durch alleinige Stimulation mit 1×10^8 KBE/ml des jeweils stärksten IL-10-induzierendem Bakterium liegen, eine Beobachtung, die auf keines der anderen drei untersuchten Zytokine zutrifft.

Die Daten bezüglich der Freisetzung der Zytokine IL-6, TNF- α , IL-12p70 und IL-10 nach simultaner vs. alleiniger Stimulation mit den fünf Kuhstallisolaten lassen sich wie folgt zusammenfassen: Die Effekte einer Kombination auf die Freisetzung der beiden proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α sind fast identisch: es lassen sich eindeutige Konzentrationsabhängigkeiten erkennen, die maximale Zytokinfreisetzung wird in beiden Fällen durch die Kombination von 1×10^6 KBE/ml je Bakterium induziert, höher konzentrierte Gemische führen zu einer Abnahme der Induktion. Selbst die höchsten gemessenen Zytokinmengen liegen deutlich unter den Niveaus, die nach Einzelstimulation mit dem jeweils stärkstem Bakterium in der gleichen Konzentration detektiert wurden. Auch in Bezug auf IL-12p70 zeigt sich bis zu einer Stimulationskonzentration von 1×10^6 KBE/ml mit steigender bakterieller Konzentration auch eine höhere Freisetzung. Die gleichzeitige Behandlung humaner DCs mit hohen Konzentrationen aller fünf Bakterien (Gesamtbakterienlast 1×10^7 oder 5×10^7 KBE/ml) allerdings führt zu einer deutlichen Inhibierung der IL-12p70-Sezernierung, es konnten keine oder nur äußerst geringe Mengen von IL-12 p70 detektiert werden. Das immunregulatorische IL-10 ist das einzige der in dieser Arbeit analysierten Zytokine, welches auch nach DC-Behandlung mit hohen Konzentrationen des 5er-Gemisches in vergleichsweise großen Mengen freigesetzt wird. Während selbst die maximal durch simultane Stimulation freigesetzten Mengen von IL-6, TNF- α und IL-12 p70 je nur einem Bruchteil der Menge entsprechen, die theoretisch durch additive Effekte freigesetzt hätte werden können (IL-6: 67 von 211 ng/ml (32 %), TNF- α : 67 von 230 ng/ml (29 %), IL-12 p70: 1,58 von 12 ng/ml (13 %)), entspricht die simultan induzierte IL-10-Menge immerhin 54 % der Menge, die durch rein additive Induktion freigesetzt worden wäre (ausgehend vom Mittelwert).

3.4.2 Reifungsinduktion humaner DCs

Die bisher gezeigten Daten unterstützen die bereits angedeutete Hypothese, dass die gleichzeitige Verwendung mehrerer, verschiedener Kuhstallbakterien bei der Stimulation humaner DCs im Vergleich zu den entsprechenden Einzelstimulationen zu einer veränderten Aktivierung und zur Induktion eines anderen T-Zell-Polarisierungsphänotyps führt. Aus diesem Grunde wurde auch in diesem Abschnitt eine Reihe von Analysen durchgeführt, die Aufschluss über die Bakterien-induzierte T-Zell-Polarisation - DC-vermittelt oder direkt in Kokulturen - geben können.

Zu diesem Zweck wurde zunächst erneut die Bakterien-induzierte Reifung der stimulierten DCs anhand der Oberflächenexpression von CD80 und CD86 mittels FACS-Analysen überprüft. Da durch Stimulationen mit der Kombination von 1×10^7 KBE/ml jeden Bakteriums (5×10^7 KBE/ml Gesamtbakterienlast) in den bisherigen Versuchen die stärksten Effekte erzielt werden konnten, wurden alle weiteren Experimente mit dieser Konzentration durchgeführt, um auch weiterhin Vergleiche mit den Einzelstimulationen anstellen zu können, wurde zusätzlich die Kombination mit einer Gesamtkonzentration von 1×10^7 KBE/ml verwendet, wobei dies aus methodischen Gründen bei Kokultur-Versuchen nicht durchsetzbar war.

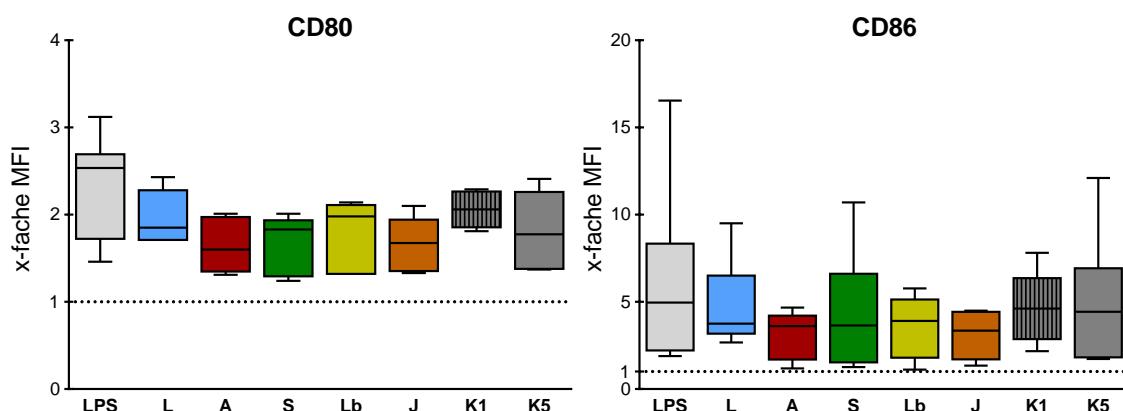


Abb.26: Expression kostimulatorischer Moleküle auf humanen DCs nach Einzel-oder simultaner Stimulation mit *L. lactis*, *A. Iwoffii*, *S. sciuri*, *J. psychrophilus* und *Lb. curvatus*

Humane DCs wurden für 20 h entweder mit 1×10^7 KBE/ml von nur einem der angegebenen Bakterien, 1×10^7 KBE/ml des Gemisches der fünf Bakterien ($0,2 \times 10^7$ KBE/ml je Bakterium, K1), 5×10^7 KBE/ml des Gemisches der fünf Bakterien (1×10^7 KBE/ml je Bakterium, K5), Medium oder 100 ng/ml LPS inkubiert und die Oberflächenexpression von CD80 und CD86 mittels FACS bestimmt. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) mit Median von n = 6 Spendern normalisiert auf die jeweiligen Medium-Kontrollen.

A, *Acinetobacter Iwoffii* F78; **J**, *Jeotgalicoccus psychrophilus* W713; **K1**, Kombination, Gesamtkonzentration 1×10^7 KBE/ml; **K5**, Kombination, Gesamtkonzentration 5×10^7 KBE/ml **L**, *Lactococcus lactis* G121; **Lb**, *Lactobacillus curvatus*; **S**, *Staphylococcus sciuri* W620

Ergebnisse

Wie aus den bereits in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten oder aus vorherigen Dissertationen bekannt^{173,151}, sind alle fünf Bakterien in der Lage, eine Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 zu induzieren, lediglich in der Stärke dieser Induktion unterscheiden sich die einzelnen Spezies voneinander (Abb.26).

Die simultane Stimulation der DCs mit einer Gesamtzahl von 1×10^7 KBE/ml (K1) bewirkt im Median die stärkste bakteriell-induzierte Hochregulation von CD80 (Abb.26, links). Die fünffache Konzentration des Bakteriengemisches (5×10^7 KBE/ml, K5) führt im Vergleich zu einer tendenziell niedrigeren Expression von CD80, der Median liegt auf etwa derselben Höhe, wie die nach Behandlung mit 1×10^7 KBE/ml von *A. Iwoffii* oder *J. psychrophilus* ermittelten Mediane, die in diesem Datensatz die geringsten Induktionen anzeigen. Bei Betrachtung der Einzelwerte aber lassen sich -abgesehen von den Daten der LPS-Stimulation, welche insgesamt zur höchsten Induktion führt- die jeweils höchsten Expressionsniveaus nach Stimulation mit *L. lactis* oder der Kombination K1 ausmachen. Die CD86-Expression wird grundsätzlich durch alle verwendeten Stimuli deutlich stärker hochreguliert als die von CD80 (Abb.26, rechts). Die Mediane der beiden simultanen Stimulationen (K1 und K5) liegen auf etwa gleicher Höhe und sind etwas höher als alle Mediane der Einzelstimulationen, die ebenfalls alle auf nahezu gleicher Höhe liegen. Die Datenpunkte, die jeweils deutlich außerhalb des Bereichs der Verteilung der restlichen Daten liegen, stammen alle von dem gleichen DC-Spender.

3.4.3 Einfluss auf die T_H1-Polarisierung

Um der Frage nach einer veränderten T-Zell-Polarisierungskapazität humaner DCs nach simultaner Stimulation mit den fünf Kuhstallisolaten weiter nachzugehen, wurden eine Reihe T-Zell-polarisierender Moleküle untersucht, zunächst diejenigen, welche mit der Ausrichtung einer T-Zellantwort zugunsten von T_H1-Zellen in Verbindung gebracht werden. Neben der Freisetzung von IL-12p70 (siehe Abb.21, S.66) wurde zusätzlich die Induktion der ebenfalls T_H1-polarisierenden Zytokine IL-18 und IFN- β auf Proteinebene untersucht.

Ergebnisse

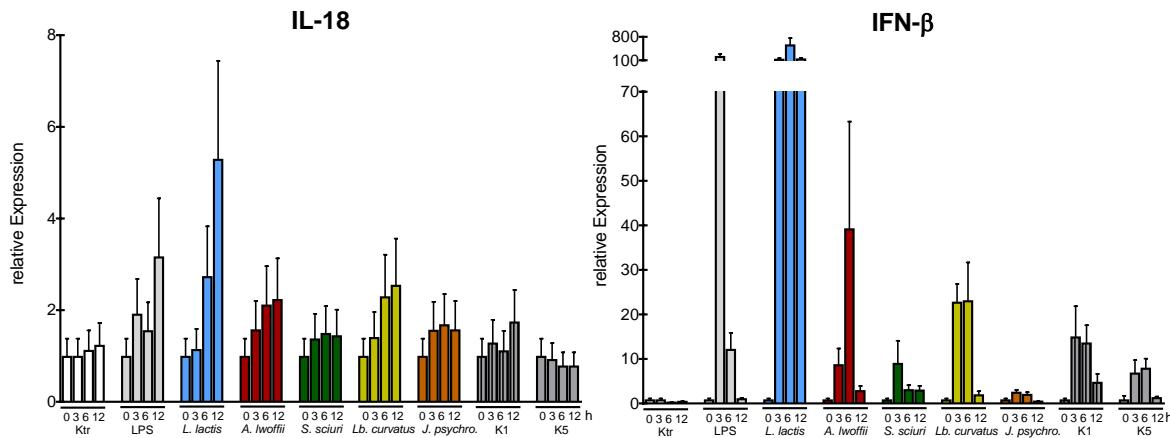


Abb.27: Expression der IL-18- und IFN-β-mRNA in humanen DCs nach Einzel-oder simultaner Stimulation mit *L. lactis*, *A. Iwoffii*, *S. sciuri*, *Lb. curvatus* und *J. psychrophilus*

Humane DCs wurden für 0, 3, 6 und 12 h mit 10^7 KBE/ml der angegebenen Bakterien, 1×10^7 KBE/ml des Gemisches der fünf Bakterien (**K1**), 5×10^7 KBE/ml des Gemisches der fünf Bakterien (**K5**), Medium (**Ktr**) oder 100 ng/ml **LPS** inkubiert. Nach Gewinnung der RNA und anschließender reverser Transkription wurde die Expression mittels qPCR relativ zu den Referenzgenen HPRT, B2M und PGK1 bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler von n=6-7 Spendern.

Bei Betrachtung der relativen Expressionsdaten der IL-18-mRNA (Abb.27, links) wird zunächst deutlich, dass diese bereits in unstimulierten DCs exprimiert wird (Ktr). Mit Bezug auf diese konstitutive Expression wird die Expression durch alle Einzelstimulationen, die Kombination von $0,2 \times 10^7$ KBE/ml je Bakterium (K1) und die Behandlung mit 100 ng/ml LPS erhöht, wobei sich unter all diesen Bedingungen eine ähnliche Kinetik mit einem Maximum nach 6 und/oder 12 h zeigt. Die stärkste Hochregulation zeigt sich unter Einfluss des *L. lactis*, die schwächste nach Stimulation mit *S. sciuri*, *J. psychrophilus* oder K1. Nach simultaner Stimulation huDCs mit einer Gesamtbakterienlast von 5×10^7 KBE/ml (K5) hingegen zeigt sich im Vergleich zu den nicht stimulierten DCs keine Veränderung der Expression der IL-18-mRNA.

Auch in Bezug auf die relative Expression der IFN-β-mRNA (Abb.27, rechts) lässt sich erkennen, dass alle verwendeten Bakterien in der Lage sind, diese zu induzieren. Die fünf verschiedenen Kuhstallisolate führen hierbei zu sehr unterschiedlichen Kinetiken und auch relativen Mengen der IFN-β-mRNA. Die zeitlichen Verläufe der relativen Expression nach simultaner Stimulation sind unter Verwendung beider Gesamtkonzentrationen vergleichbar: Nach 3-stündiger Stimulation wird das jeweilige Maximum erreicht, welches nach weiteren 3 h immer noch nachweisbar ist. Nach 12-stündiger Inkubation der Zellen mit 1×10^7 KBE/ml des Bakteriengemisches ist die mRNA-Menge im Vergleich zur Ausgangsmenge (0h-Wert) immer noch leicht erhöht, nach simultaner Stimulation mit der fünffachen Gesamtkonzentration hingegen wurde nach 12 h eine Menge detektiert, die auch in etwa in

Ergebnisse

unstimulierten Zellen festgestellt werden kann (0h-Wert). Im Vergleich ist die relative Expression nach Behandlung mit 1×10^7 KBE/ml etwas höher als nach Behandlung mit 5×10^7 KBE/ml, insgesamt liegen aber alle nach simultaner Stimulation gemessenen Werte deutlich unter den korrespondierenden Werten, die nach Einzelstimulation ermittelt wurden. Lediglich in Bezug auf die Mengen, die durch Stimulation mit *J. psychrophilus*, dem Bakterium, das die schwächste Expression induziert, bewirken die simultanen Stimulationen eine etwas höhere Expression der IFN- β -mRNA.

Des Weiteren wurden die mRNA-Expressionen der beiden T_H1-assoziierten Oberflächenmoleküle ICAM-1 und DLL4 mittels RT-qPCR über einen Zeitraum von 12 h nach alleiniger vs. simultaner Stimulation untersucht.

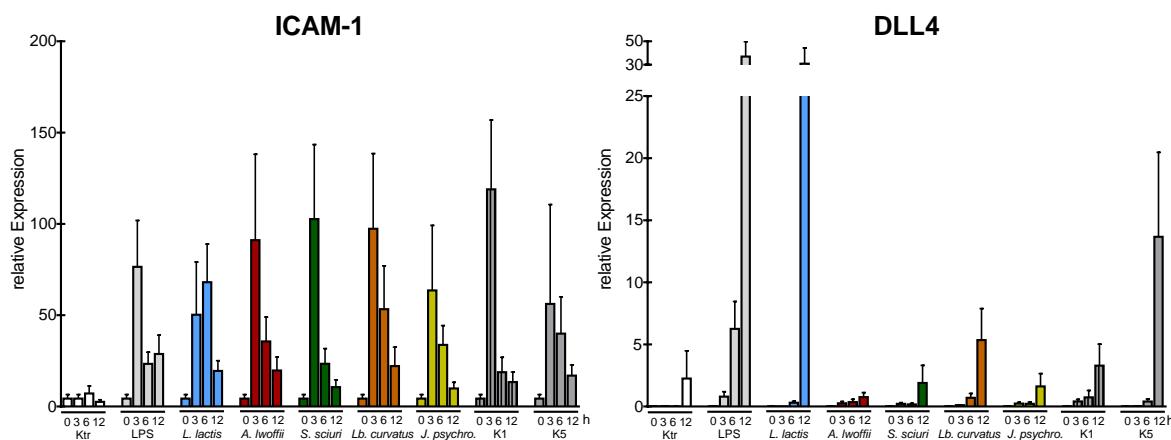


Abb.28: Expression der ICAM-1- und DLL4-mRNA in humanen DCs nach Einzel-oder simultaner Stimulation mit *L. lactis*, *A. Iwoffii*, *S. sciuri*, *Lb. curvatus* und *J. psychrophilus*

Humane DCs wurden für 0, 3, 6 und 12 h mit 10^7 KBE/ml der angegebenen Bakterien, 1×10^7 KBE/ml des Gemisches der fünf Bakterien (**K1**), 5×10^7 KBE/ml des Gemisches der fünf Bakterien (**K5**), Medium (**Ktr**) oder 100 ng/ml LPS inkubiert. Nach Gewinnung der RNA und anschließender reversen Transkription wurde die Expression mittels qPCR relativ zu den Referenzgenen HPRT, B2M und PGK1 bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler von n=7 Spendern.

In Bezug auf die relative ICAM-1-mRNA-Expression induzieren alle verwendeten Stimuli die gleiche Kinetik (Abb.28, links): nach 3-stündiger Stimulation ist das jeweilige Maximum der induzierbaren relativen mRNA-Menge erreicht, innerhalb der nächsten 9 h sinkt das Expressionsniveau wieder ab, ist im Vergleich zur Mediumkontrolle nach 12 h aber immer noch erhöht. Eine Ausnahme diesbezüglich stellt die Stimulation mit *L. lactis* dar, deren maximale Induktion erst nach 6 h erreicht ist. Beim Vergleich aller Bedingungen untereinander wird deutlich, dass die maximale, relative Expression durch 3-stündige Stimulation mit 1×10^7 KBE/ml des Bakteriengemisches bewirkt wird. Die Verläufe und auch die Mengen der relativen Expression nach simultaner Stimulation mit 1×10^7 und 5×10^7 KBE/ml unterscheiden sich voneinander. So liegt das Maximum, detektierbar nach 3 h, nach

Ergebnisse

Inkubation mit nur 1×10^7 KBE/ml deutlich höher als das durch Stimulation mit insgesamt 5×10^7 KBE/ml bewirkte. Der 6-Stunden-Wert der 1×10^7 KBE/ml-Stimulation aber liegt deutlich unter dem des 5×10^7 KBE/ml-Wertes, nach 12 h hingegen liegen die jeweiligen relativen Expressionen wieder auf einem vergleichbaren Niveau.

Auch hinsichtlich der Expression der DLL4-mRNA (Abb.28, rechts) in Relation zu den drei Referenzgenen HPRT, B2M und PGK1 zeigen sich unter Einfluss aller getesteten Stimuli gleiche Kinetiken, das jeweilige Maximum ist nach 12-stündiger Inkubation erreicht, wobei auch in den Kontrollzellen nach 12 h eine leichte Zunahme der Expression festgestellt wurde. Im Vergleich zur relativen DLL4-mRNA-Expression, die durch Stimulation mit 5×10^7 KBE/ml induziert wird, ist die nach Einfluss von 1×10^7 KBE/ml ermittelte Expression geringer: die relative, maximal induzierte mRNA-Menge ist nach Stimulation mit 5×10^7 KBE/ml zwar geringer als die durch *L. lactis* induzierte, aber höher als die Mengen, die nach Einzelstimulationen mit allen anderen Bakterien gemessen wurden. Das Maximum der relativen Expression nach Inkubation der DCs mit nur 1×10^7 KBE/ml hingegen liegt unter dem, welches nach *Lb. curvatus*-Behandlung ermittelt wurde.

Zusätzlich wurden Kokulturen vorstimulierter DCs mit autologen TCs auf das Vorhandensein der mRNA des T_H1-zellspezifischen Transkriptionsfaktors T-bet und des vornehmlich von T_H1-Zellen sezernierten IL-2 untersucht.

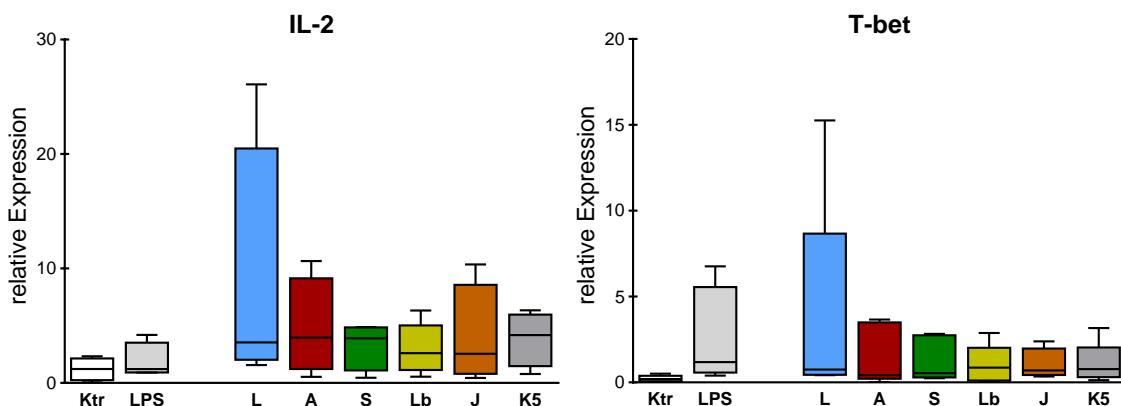


Abb.29: Expression der T-bet- und IL-2-mRNA in Kokulturen humaner DCs mit autologen T-Zellen nach Einzel-oder simultaner Stimulation mit *L. lactis*, *A. Iwoffii*, *S. sciuri*, *Lb. curvatus* und *J. psychrophilus*

Humane DCs wurden für 20 h mit 10^7 KBE/ml der angegebenen Bakterien, 5×10^7 KBE/ml des Gemisches der fünf Bakterien (K5), Medium (Ktr) oder 100 ng/ml LPS inkubiert und anschließend für 5d mit naiven, autologen CD4⁺ T-Zellen im Verhältnis 1:10 (DC:TC) kokultiviert. Nach Gewinnung der RNA und anschließender reverser Transkription wurde die Expression mittels qPCR relativ zu den Referenzgenen HPRT, RPL27 und RPL30 bestimmt. Dargestellt sind die zusammengefassten Daten von n=5 Spendern als Boxplot nach Tukey.

A, *Acinetobacter Iwoffii* F78; **J**, *Jeotgalicoccus psychrophilus* W713; **K5**, Kombination, Gesamtkonzentration 5×10^7 KBE/ml; **Ktr**, Kontrolle **L**, *Lactococcus lactis* G121; **Lb**, *Lactobacillus curvatus*; **S**, *Staphylococcus sciuri* W620

Ergebnisse

Alle verwendeten Bakterien und auch die Kombination aller Bakterien induzieren die Expression der IL-2-mRNA (Abb.29, links). Es ist aber unter allen Bedingungen erkennbar, dass jeweils nur in einem Teil der Kokulturen ein höheres, relatives Expressionsniveau erreicht wird, als in den Kontrollzellen. Mit Bezug auf den Median wurde die stärkste Induktion nach DC-Vorstimulation mit *A. Iwoffii*, *S. sciuri* und *L. lactis* gemessen, wobei die durch *L. lactis*-aktivierten Kokulturen eine deutliche Streuung hin zu höheren Werten zeigen. Die gleichzeitige Verwendung aller fünf Bakterien induziert im Median eine Expression, die mit diesen Kokulturen vergleichbar ist. Die schwächste bakterielle Induktion kann unter Einfluss des *Lb. curvatus* und *J. psychrophilus* festgestellt werden.

Auch die Mengen der T-bet mRNA sind nach Vorbehandlung der DCs mit allen verwendeten Stimuli im Vergleich zu den Kontrollzellen leicht erhöht (Abb.29, rechts), doch auch in diesem Kontext gilt dies jeweils nur für einen Teil der Spender. Gemessenen am Median bewirkt die Kokultur mit DCs, die mit 10^7 KBE/ml von *L. lactis*, *Lb. curvatus*, *J. psychrophilus* oder mit der 5×10^7 KBE/ml der Kombination aller fünf Isolate stimuliert wurden, jeweils eine etwa gleich starke Induktion des Transkriptionsfaktors, wobei die durch *L. lactis*-aktivierten Kokulturen eine deutliche Streuung hin zu höheren Werten zeigen. Die Kokulturen mit *A. Iwoffii*- oder *S. sciuri* -stimulierten DCs weisen nur bei zwei von fünf Spendern höhere T-bet-mRNA-Mengen auf als die unstimulierten Kokulturen.

Unter der Fragestellung einer T_{H1} -Induktion unter Einfluss einer simultanen Vorstimulation humaner DCs im Vergleich zu einzelstimulierten DCs wurde zusätzlich die Freisetzung der Zytokine TNF- α und IFN- γ aus Kokulturen mittels ELISA untersucht.

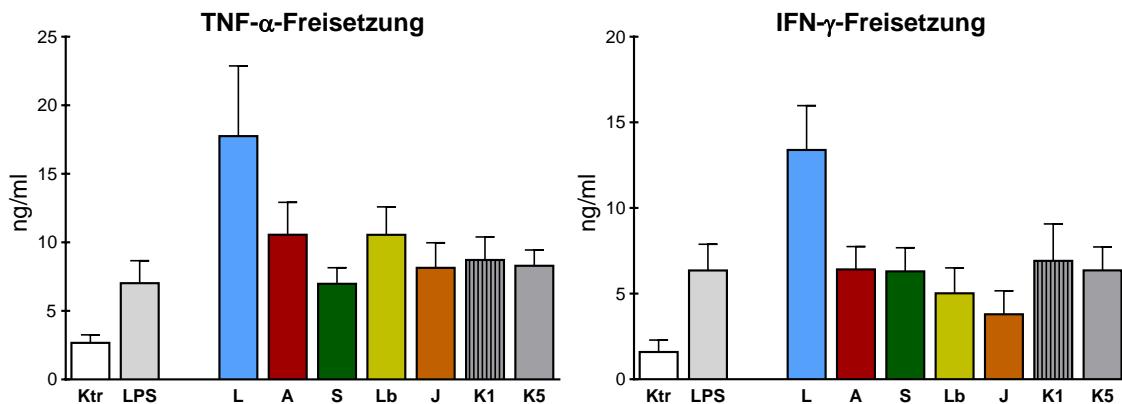


Abb.30: Freisetzung von TNF- α und IFN- γ aus Kokulturen humaner DCs mit autologen T-Zellen nach Einzel- oder simultaner Stimulation mit *L. lactis*, *A. Iwoffii*, *S. sciuri*, *Lb. curvatus* und *J. psychrophilus*

Humane DCs wurden entweder mit 1×10^7 KBE/ml von nur einem der angegebenen Bakterien, 1×10^7 KBE/ml des Gemisches der fünf Bakterien (K1), 5×10^7 KBE/ml des Gemisches der fünf Bakterien (K5), Medium (Ktr) oder 100 ng/ml LPS inkubiert. Nach 20 h wurden die Überstände gewonnen und der Zytokingehalt mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler von $n = 8$ (TNF- α) und 16 (IFN- γ) Spendern.

A, *Acinetobacter Iwoffii* F78; **J**, *Jeotgalicoccus psychrophilus* W713; **K1**, Kombination, Gesamtkonzentration 1×10^7 KBE/ml; **K5**, Kombination, Gesamtkonzentration 5×10^7 KBE/ml; **Ktr**, Kontrolle; **L**, *Lactococcus lactis* G121; **Lb**, *Lactobacillus curvatus*; **S**, *Staphylococcus sciuri* W620

Alle verwendeten Stimuli führen im Vergleich zu den Medium-behandelten DCs (Ktr), die bereits geringe Mengen von TNF- α freisetzen, zu einer verstärkten TNF- α -Sekretion (Abb.30, links). Die größten TNF- α -Mengen wurden im Mittel nach 20-stündiger Inkubation der Zellen mit *L. lactis* detektiert, die geringsten nach *S. sciuri*-Behandlung. Die Zytokinfreisetzung, die durch simultane Stimulation induziert wurde, ist unter Verwendung der beiden verschiedenen Konzentrationen (1×10^7 und 5×10^7 KBE/ml) vergleichbar stark und liegt im Mittel auf etwa gleicher Höhe, wie die durch *J. psychrophilus*-Stimulation bewirkte Sekretion. Durch die gleichzeitige Verwendung aller fünf Bakterien zur Stimulation humaner DCs werden also deutlich geringere Mengen von TNF- α induziert, als es durch Einzelstimulation mit einigen der im Gemisch enthaltenen Bakterien in gleicher Konzentration der Fall ist (*L. lactis*, *A. Iwoffii* und *Lb. curvatus*).

Ein sehr ähnliches Bild zeigt sich auch in Bezug auf die gemessenen IFN- γ -Daten (Abb.30, rechts). Bereits die unstimulierten Zellen setzen geringe Mengen an IFN- γ frei, dennoch führen alle verwendeten Behandlungen zu einer im Vergleich dazu erhöhten Sekretion des Zytokins. Auch in diesem Kontext bewirkt eine Inkubation mit *L. lactis* die stärkste Induktion, die geringsten IFN- γ -Mengen wurden unter Einfluss von *Lb. curvatus* und *J. psychrophilus* sezerniert. Auch hinsichtlich der IFN- γ -Freisetzung führt die Stimulation der DCs mit den zwei verschiedenen Konzentrationen des Bakteriengemisches zu IFN- γ -Mengen, die miteinander

Ergebnisse

vergleichbar sind. Im Mittel entsprechen die gemessenen Zytokinmengen nach simultaner Stimulation etwa denen, die auch nach Behandlung der Zellen mit *A. Iwoffii* oder *S. sciuri* ermittelt wurden, folglich ist die durch Stimulation mit allen fünf Bakterien gleichzeitig erwirkte IFN- γ -Freisetzung geringer als diejenige, die durch alleinige Stimulation mit der gleichen oder einem Fünftel der Konzentration von *L. lactis* induziert wurde.

3.4.4 Einfluss auf die T_H2-Polarisierung

Da sich eine reduzierte Differenzierung naiver T-Zellen zu T_H2-Zellen allergieprotektiv auswirken kann, wurden auch eine Reihe T_H2-polarisierender Mediatoren untersucht. Zunächst wurde die Expression der zwei Oberflächenmoleküle OX40-L und Jagged-1 über einen Zeitraum von 12 h in bakteriell stimulierten DCs mittels RT-qPCR analysiert.

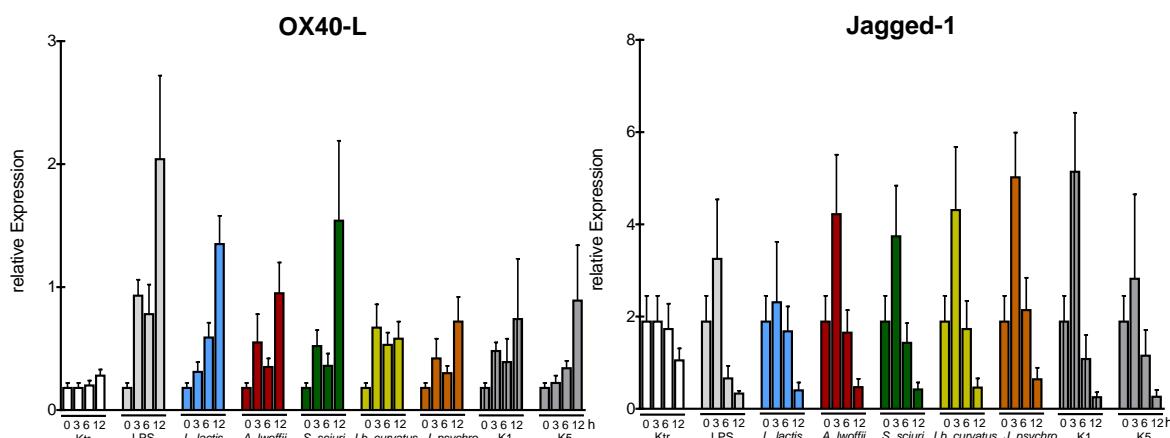


Abb.31: Expression der OX40-L- und Jagged-1-mRNA in humanen DCs nach Einzel- oder simultaner Stimulation mit *L. lactis*, *A. Iwoffii*, *S. sciuri*, *Lb. curvatus* und *J. psychrophilus*

Humane DCs wurden für 0, 3, 6 und 12 h mit 10^7 KBE/ml der angegebenen Bakterien, 1×10^7 KBE/ml des Gemisches der fünf Bakterien (K1), 5×10^7 KBE/ml des Gemisches der fünf Bakterien (K5), Medium (Ktr) oder 100 ng/ml LPS inkubiert. Nach Gewinnung der RNA und anschließender reverser Transkription wurde die Expression mittels qPCR relativ zu den Referenzgenen HPRT, B2M und PGK1 bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler von n=7 Spendern.

Mit Ausnahme des *L. lactis* führen alle Einzelstimulationen und auch die mit 100 ng/ml LPS zu einer ähnlichen Kinetik der relativen Expression der OX40-L-mRNA (Abb.31, links): ausgehend von einer Grundexpression, die bereits in unstimulierten Zellen vorliegt, wird nach 3 h ein erstes Maximum erreicht, nach weiteren 3 h ist die Expression im Vergleich zum 3-Stunden-Wert wieder etwas geringer und erreicht nach insgesamt 12-stündiger Stimulation ihr jeweiliges Maximum, welches im Vergleich zur Mediumkontrolle in allen Fällen erhöht ist. Unter Einfluss von 1×10^7 KBE/ml des *L. lactis* hingegen ergibt sich eine

Ergebnisse

Kinetik, die schrittweise ansteigt und ihr Maximum nach 12h aufweist. Insgesamt wird die maximale, relative Expression von OX40-L-mRNA durch Stimulation der DCs mit *S. sciuri* induziert (12 h-Wert), die geringsten Werte lassen sich nach Behandlung mit *Lb. curvatus* verzeichnen. Die Verwendung der zwei unterschiedlich konzentrierten Bakteriengemische (1×10^7 und 5×10^7 KBE/ml) zur Stimulation humaner DCs führen zu unterschiedlichen Kinetiken. So gleicht der Verlauf der relativen Expression nach Behandlung der Zellen mit 5×10^7 KBE/ml derjenigen, die durch Einzelstimulation mit *L. lactis* induziert wurde, eine Stimulation mit nur einem Fünftel der Gesamtbakterienlast hingegen führt zu einer Kinetik mit zwei Maxima, gleicht also der durch alle anderen verwendeten Stimuli induzierten Kinetik. Bis zu einer Simulationsdauer von 6 h lassen sich die größeren mRNA-Mengen nach Inkubation mit 1×10^7 KBE/ml messen, nach 12 h hingegen weisen die mit 5×10^7 KBE/ml-stimulierten DCs im Mittel ein höheres Expressionslevel auf.

In Hinblick auf die ermittelten mRNA-Daten von Jagged-1 (Abb.31, rechts) zeigen die Kinetiken, die nach Stimulation humaner DCs mit *L. lactis*, *A. Iwoffii*, *S. sciuri*, *Lb. curvatus* oder *J. psychrophilus* und auch den verschiedenen konzentrierten Kombinationen dieser Bakterien gemessen werden konnten, alle einen ähnlichen Verlauf: ausgehend von einem konstitutiv exprimierten Grundniveau (Ktr) ist nach 3 h ein Anstieg zu verzeichnen, der auch das jeweilige Maximum darstellt, nach weiteren 3 h kommt es zu einer Abnahme der Expressionshöhe auf ein Niveau, welches auf dem des Ausgangsniveaus oder leicht darunterliegt (Ausnahme: *J. psychrophilus*). Nach 12 h ist die Expression der Jagged-1-mRNA unter allen Bedingungen im Vergleich zu den Kontrollzellen erniedrigt. Die höchste Expression nach Einzelstimulation wird unter Einfluss des *J. psychrophilus* induziert, die geringste durch *L. lactis*-Behandlung. Die simultane Stimulation humaner DCs mit dem Gemisch von $0,2 \times 10^7$ KBE/ml je Bakterium führt insgesamt zur stärksten Induktion der mRNA-Expression von Jagged-1 (3 h-Wert), diese sinkt aber innerhalb der nächsten 3 h im Vergleich zu den Einzelstimulationen mit Bezug auf die Medium-Kontrollen auch am stärksten wieder ab und nach 12 h weisen die so stimulierten DCs im Vergleich zu den unbehandelten Zellen die geringsten mRNA-Mengen auf. Die maximale, relative Expression, welche nach Stimulation mit der Kombination aller Bakterien mit einer Gesamtkonzentration von 5×10^7 KBE/ml detektierbar ist (K5), ist im Vergleich dazu deutlich geringer und liegt nur wenig über der, die unter Einfluss des *L. lactis* induziert wurde. Die 6- und 12 h-Werte

Ergebnisse

wiederum liegen auf etwa selber Höhe, wie die durch simultane Stimulation mit 1×10^7 KBE/ml bewirkten.

Nach Stimulation humaner DCs mit den Kuhstallisolaten *L. lactis*, *A. Iwoffii*, *S. sciuri*, *Lb. curvatus* und *J. psychrophilus* und auch mit einem Gemisch dieser fünf Bakterien konnte also eine Reduktion des Oberflächenmoleküls Jagged-1 festgestellt werden. Eine Bindung dieses kostimulatorischen Moleküls an das T-Zell-Oberflächenmolekül Notch führt zu einer T_{H2} -Polarisation. Inwieweit die bakteriell-induzierte Expressionsreduktion dieses Liganden zu einer verminderten Ausprägung von T_{H2} -Zellen führt, wurde mit Hilfe von Kokulturen überprüft. In diesen wurde nicht nur die mRNA-Expression der typischen T_{H2} -Zytokine IL-5 und IL-13 überprüft, sondern auch die Expression des Transkriptionsfaktors GATA3, welcher zur Identifizierung von T_{H2} -Zellen herangezogen werden kann.

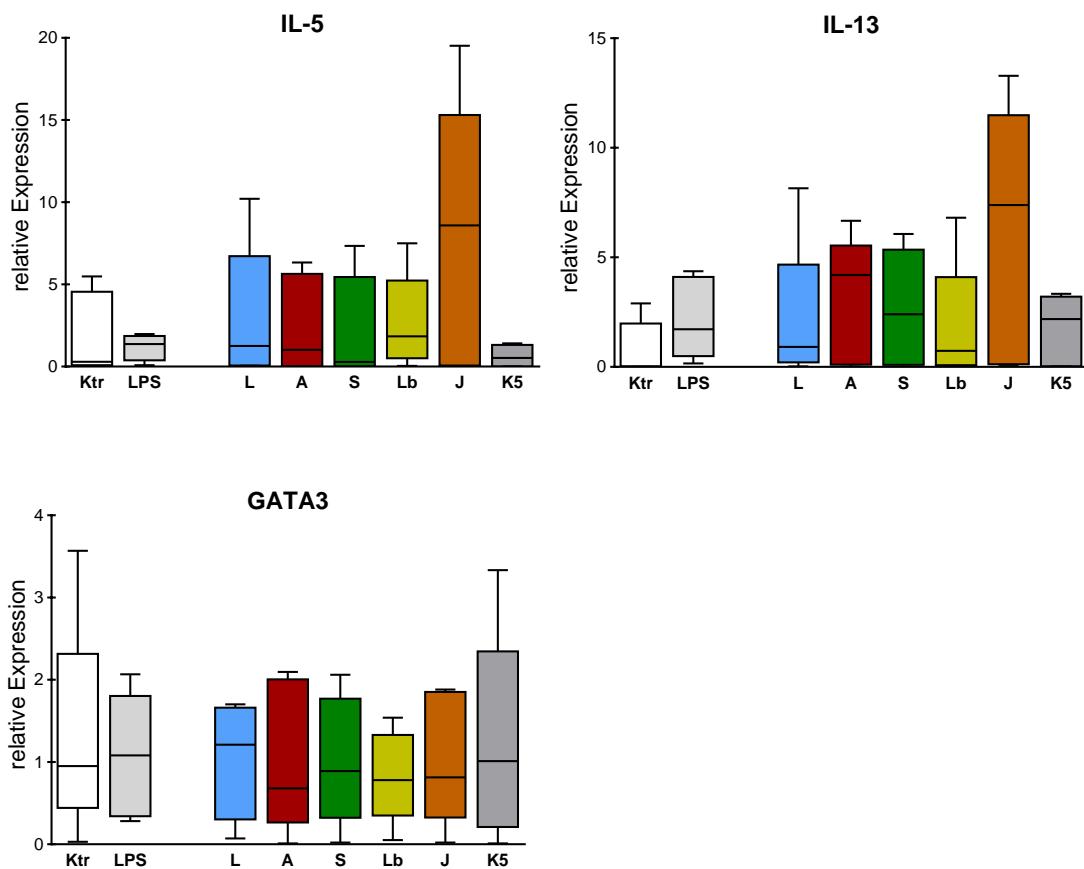


Abb.32: Expression der IL-5, IL-13- und GATA3-mRNA in Kokulturen humaner DCs mit autologen T-Zellen nach Einzel-oder simultaner Stimulation mit *L. lactis*, *A. Iwoffii*, *S. sciuri*, *Lb. curvatus* und *J. psychrophilus*

Humane DCs wurden für 20 h mit 10^7 KBE/ml der angegebenen Bakterien, 5×10^7 KBE/ml des Gemisches der fünf Bakterien (K5), Medium (Ktr) oder 100 ng/ml LPS inkubiert und anschließend für 5d mit naiven, autologen CD4⁺ T-Zellen im Verhältnis 1:10 (DC:TC) kokultiviert. Nach Gewinnung der RNA und anschließender reverser Transkription wurde die Expression mittels qPCR relativ zu den Referenzgenen HPRT, RPL27 und RPL30 bestimmt. Dargestellt sind die zusammengefassten Daten von n=5 Spendern als Boxplot nach Tukey.

A, *Acinetobacter Iwoffii* F78; **J**, *Jeotgalicoccus psychrophilus* W713; **K5**, Kombination, Gesamtkonzentration 5×10^7 KBE/ml; **Ktr**, Kontrolle **L**, *Lactococcus lactis* G121; **Lb**, *Lactobacillus curvatus*; **S**, *Staphylococcus sciuri* W620

Ergebnisse

Die mRNA von IL-5 kann teilweise bereits in den Kokulturen, die unstimulierte DCs enthalten (Ktr), nachgewiesen werden (Abb.32, oben links). Im Vergleich zu diesen Daten induzieren alle Einzelstimulationen zumindest bei einem Teil der Spender eine leichte Erhöhung der IL-5-mRNA-Menge, was im Median zu Expressionsniveaus führt, die höher sind als die mediane Expression der Kontroll-Kulturen. Nach Behandlung der DCs mit *J. psychrophilus* ist diese Erhöhung besonders ausgeprägt. Nach simultaner Vorstimulation der DCs hingegen wurden in keiner der Kokulturen Expressionswerte gemessen, die höher sind als die der nicht-aktivierten Kokulturen (mit Bezug auf die Einzelwerte).

Auch die mRNA von IL-13 wird in einigen Spendern konstitutiv exprimiert (Abb.32 oben rechts), in Relation zu den ausgewählten Referenzgenen aber etwas geringer als die von IL-5. Alle Einzelvorstimulationen der DCs induzieren in etwa der Hälfte der Spender im Vergleich zur konstitutiven Expression eine Hochregulation, auch in diesem Kontext mit der Ausnahme, dass die Vorbehandlung der DCs mit *J. psychrophilus* zu einem deutlich stärkeren Effekt führt. Auch nach Vorstimulation der DCs mit dem Gemisch aller fünf Bakterien lassen sich in drei von fünf Spendern Expressionsniveaus nachweisen, die etwas höher sind als die der unbehandelten Kokulturen. Im Vergleich zu den anderen bakteriell-aktivierten Kokulturen ist diese Erhöhung aber deutlich geringer.

Für die mRNA-Expression des T_H2-spezifischen Transkriptionsfaktor GATA3 (Abb.32, unten) lassen sich mit Bezug auf die Kontroll-Kulturen (Ktr) keine oder nur leichte Veränderungen der detektierbaren mRNA-Menge feststellen. So liegen die Mediane der relativen GATA3-mRNA-Expression nach Prä-Inkubation der DCs mit *A. Iwoffii*, *S. sciuri*, *Lb. curvatus* und *J. psychrophilus* leicht unter denen der Kontrollkulturen, unter Einfluss von *L. lactis* und der Kombination aller fünf Bakterien zeigt sich eine leichte Hochregulation der mRNA.

Ergebnisse

Zusätzlich wurde die Freisetzung des ebenfalls vorrangig von T_{H2} -Zellen sezernierten Zytokins IL-4 nach Restimulation der Kokulturen mittels ELISA überprüft.

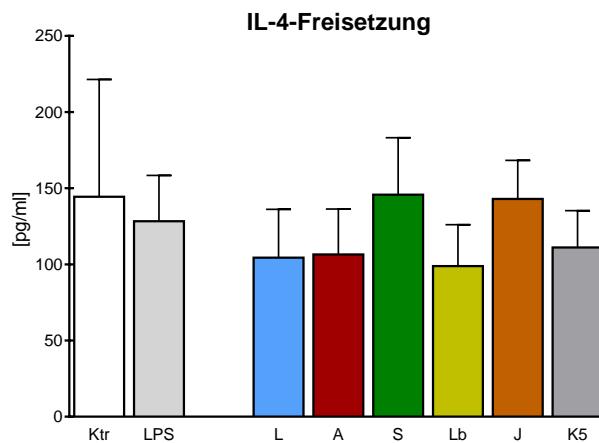


Abb.33:Freisetzung von IL-4 aus Kokulturen humaner DCs mit autologen T-Zellen nach Einzel-oder simultaner Stimulation mit *L. lactis*, *A. Iwoffii*, *S. sciuri*, *Lb. curvatus* und *J. psychrophilus*

Humane DCs wurden für 20 h mit 10^7 KBE/ml der angegebenen Bakterien, 5×10^7 KBE/ml des Gemisches der fünf Bakterien (K5), reinem Medium (Ktr) oder 100 ng/ml LPS inkubiert und anschließend für 5d mit naiven, autologen CD4 $^+$ T-Zellen im Verhältnis 1:10 (DC:TC) kokultiviert. Nach 5-stündiger Restimulation mit PMA/Ionomycin wurde die Konzentration von der Zytokine in den Überständen mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler von n=7 Spendern.

A, *Acinetobacter Iwoffii* F78; J, *Jeotgalicoccus psychrophilus* W713; K5, Kombination, Gesamtkonzentration 5×10^7 KBE/ml; Ktr, Kontrolle; L, *Lactococcus lactis* G121; Lb, *Lactobacillus curvatus*; S, *Staphylococcus sciuri* W620

Grundsätzlich lassen sich in den mit PMA/Ionomycin-restimulierten Kokulturen nur sehr geringe Mengen von IL-4 nachweisen (Abb.33). TCs, die mit unstimulierten DCs kokultiviert wurden, setzen bereits IL-4 frei, keines der verwendeten Stimuli induziert die Sezernierung von IL-4 in Mengen, die über die der Kontrollkulturen hinausgehen.

3.4.5 Einfluss auf die T_{reg} -Polarisierung

Im Vergleich zu alleinigen Stimulationen humaner DCs mit *L. lactis*, *A. Iwoffii*, *S. sciuri*, *Lb. curvatus* und *J. psychrophilus* führt die simultane Stimulation humaner DCs mit diesen 5 allergieprotektiven Bakterien zu einer veränderten Freisetzung von IL-10 (Abb.25, S.75). Da dieses das zentrale Zytokin bei der Induktion von T_{reg} -Zellen darstellt, wurde der Einfluss simultaner vs. Einzelstimulationen auf die Entwicklung von T_{reg} -Zellen näher untersucht, zunächst durch Expressionsanalyse der TGF- β -mRNA in stimulierten DCs.

Ergebnisse

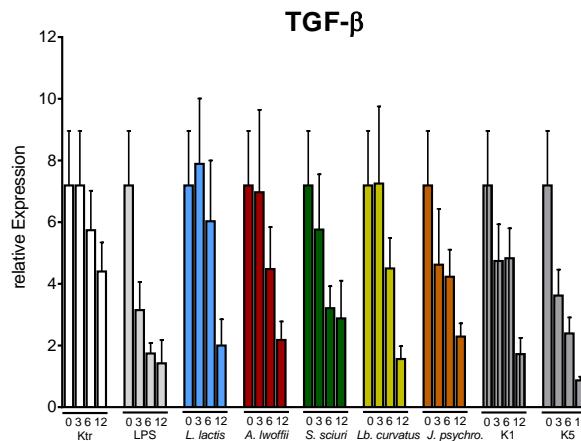


Abb.34: Expression der TGF- β -mRNA in humanen DCs nach Einzel- oder simultaner Stimulation mit *L. lactis*, *A. Iwoffii*, *S. sciuri*, *Lb. curvatus* und *J. psychrophilus*

Humane DCs wurden für 0, 3, 6 und 12 h mit 10^7 KBE/ml der angegebenen Bakterien, 1×10^7 KBE/ml des Gemisches der fünf Bakterien (K1), 5×10^7 KBE/ml des Gemisches der fünf Bakterien (K5), reinem Medium (Ktr) oder 100 ng/ml LPS inkubiert. Nach Gewinnung der RNA und anschließender reverser Transkription wurde die Expression mittels qPCR relativ zu den Referenzgenen HPRT, B2M und PGK1 bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler von n=7 Spendern

Anhand der Kontrollzellen (Ktr) lässt sich erkennen, dass die mRNA von TGF- β bereits im unstimulierten Zustand exprimiert wird (Abb.34). Ausgehend von dieser konstitutiven Expression zeigt sich nach allen verwendeten Stimuli eine Abnahme der Expression, welche über den gemessenen Zeitraum stärker wird, sodass nach 12 h im Vergleich zu den Kontrollzellen die jeweils geringsten Expressionen ermittelt wurden. Grundsätzlich lassen sich zwei verschiedene zeitliche Verläufe erkennen: Zum einen die Kinetiken, bei denen eine Reduktion der Expression bereits nach 3 h erkennbar ist, nach weiteren 3 h noch geringere Werte ermittelt wurden und nach 12 h das jeweilige Minimum erreicht ist. Dieser Verlauf kann nach Behandlung der DCs mit 100 ng/ml LPS, *S. sciuri* und dem Bakteriengemisch in einer Gesamtkonzentration von 1×10^7 KBE/ml beobachtet werden. Zum anderen die Kinetiken, die sich durch Stimulation mit *L. lactis*, *A. Iwoffii* und *Lb. curvatus* ergaben. Auch bei diesen lässt sich eine kontinuierliche Abnahme der messbaren mRNA-Menge erkennen, allerdings setzt diese erst nach 6 h ein, die 3 h-Werte liegen jeweils auf Höhe des Ausgangsniveaus. Auch unter Einfluss von *J. psychrophilus* und der Kombination von $0,2 \times 10^7$ KBE/ml je Bakterium wird die relative Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen mit zunehmender Inkubationsdauer fortlaufend geringer, allerdings liegen hier die 3- und 6 h-Werte jeweils auf etwa gleichem Niveau. Die stärkste Reduktion der TGF- β -mRNA-Expression wird unter gleichzeitigem Einfluss von 1×10^7 KBE/ml jeden Bakteriums induziert, die höchste, relative Expression- folglich die schwächste Reduktion der mRNA-Expression - wurde nach

Ergebnisse

Stimulation der DCs mit *S. sciuri* detektiert. Wie soeben beschrieben, führt die simultane Stimulation humaner DCs mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen auch zu unterschiedlichen Kinetiken, zudem ist die durch 12-stündige Behandlung der DCs mit 1×10^7 KBE/ml induzierte Reduktion der relativen TGF- β -mRNA-Expression im Vergleich zur 5×10^7 KBE/ml-bewirkten etwas schwächer.

T_{reg} -Zellen zeichnen sich u.a. durch die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 und die Freisetzung von TGF- β aus. Vor diesem Hintergrund wurde die mRNA von Kokulturen wie bereits beschrieben gewonnen und auf das Vorhandensein der entsprechenden Sequenzen untersucht.

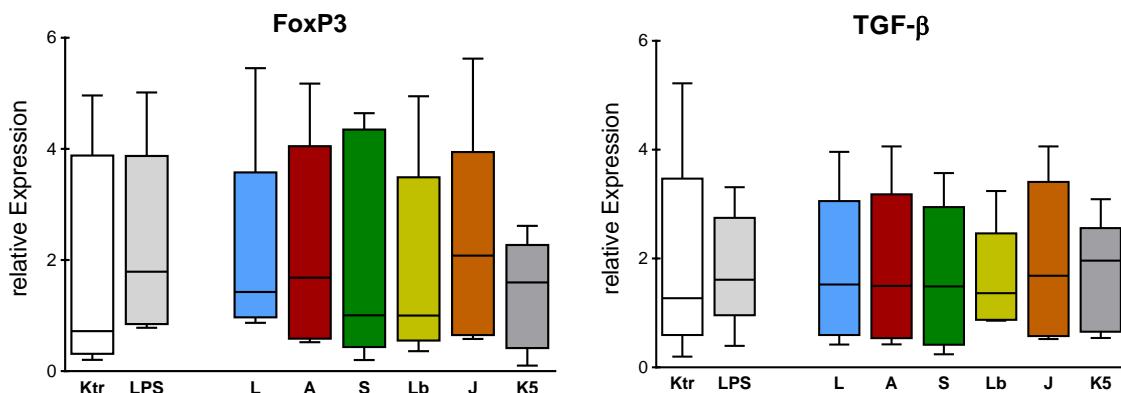


Abb.35: Expression der FoxP3- und TGF- β -mRNA in Kokulturen humaner DCs mit autologen T-Zellen nach Einzel- oder simultaner Stimulation mit *L. lactis*, *A. Iwoffii*, *S. sciuri*, *Lb. curvatus* und *J. psychrophilus*

Humane DCs wurden für 20 h mit 10^7 KBE/ml der angegebenen Bakterien, 5×10^7 KBE/ml des Gemisches der fünf Bakterien (K5), reinem Medium (Ktr) oder 100 ng/ml LPS inkubiert und anschließend für 5d mit naiven, autologen CD4 $^+$ T-Zellen im Verhältnis 1:10 (DC:TC) kokultiviert. Nach Gewinnung der RNA und anschließender reverser Transkription wurde die Expression mittels qPCR relativ zu den Referenzgenen HPRT, RPL27 und RPL30 bestimmt. Dargestellt sind die zusammengefassten Daten von n=5 Spendern als Boxplot nach Tukey.

A, *Acinetobacter Iwoffii* F78; J, *Jeotgalicoccus psychrophilus* W713; K5, Kombination, Gesamtkonzentration 5×10^7 KBE/ml; Ktr, Kontrolle L, *Lactococcus lactis* G121; Lb, *Lactobacillus curvatus*; S, *Staphylococcus sciuri* W620

Mit Bezug auf die Kontroll-Kulturen wird die relative Expression der FoxP3-mRNA durch die Vorstimulation der DCs mit den meisten der Bakterien im Median geringfügig erhöht, lediglich in den *S. sciuri*- und *Lb. curvatus*-aktivierten Kulturen lässt sich keine Erhöhung erkennen (Abb.35, links). Ausgehend vom Median lassen sich die größten relativen mRNA-Mengen nach Prä-Inkubation der DCs mit *A. Iwoffii* detektieren. Die Daten der Kokulturen, die unter Einfluss der 5er-Kombination der Bakterien entstanden sind, zeigen eine vergleichsweise geringe Streuung und einen Median, der auf etwa gleicher Höhe wie der der *L. lactis*-aktivierten Kokulturen liegt.

Ergebnisse

Die Mediane der TGF- β -mRNA-Expression der Kokulturen mit den einzeln vorstimulierten DCs liegen alle auf einem vergleichbaren, im Vergleich zu den nicht-aktivierten Kokulturen minimal erhöhtem, Niveau (Abb.35, rechts). Nach simultaner Vorstimulation der DCs hingegen zeigt sich im Median eine leichte Erhöhung der detektierten mRNA-Menge.

Auch das immunsupprimierende IL-10 ist ein Zytokin, welches u.a. von T_{reg} -Zellen freigesetzt werden kann. Um die Entwicklung dieser TC-Subpopulation unter Einfluss einer Einzel- vs. simultaner Stimulation der fünf Kuhstallisolale weiter untersuchen zu können, wurde die Freisetzung von IL-10 in den unterschiedlich aktivierten Kokulturen mittels ELISA bestimmt.

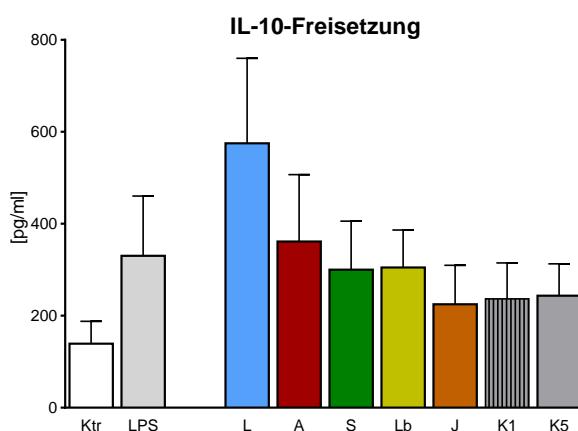


Abb.36:Freisetzung von IL-10 aus Kokulturen humaner DCs mit autologen T-Zellen nach Einzel-oder simultaner Stimulation mit *L. lactis*, *A. lwoffii*, *S. sciuri*, *Lb. curvatus* und *J. psychrophilus*

Humane DCs wurden für 20 h mit 10^7 KBE/ml der angegebenen Bakterien, 1×10^7 KBE/ml des Gemisches der fünf Bakterien (K1), 5×10^7 KBE/ml des Gemisches der fünf Bakterien (K5), reinem Medium (Ktr) oder 100 ng/ml LPS inkubiert und anschließend für 5d mit naiven, autologen CD4 $^+$ T-Zellen im Verhältnis 1:10 (DC:TC) kokultiviert. Nach 5-stündiger Restimulation mit PMA/Ionomycin wurde die Konzentration von der Zytokine in den Überständen mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler von n=15 Spendern (n=8 für K1).

A, *Acinetobacter lwoffii* F78; J, *Jeotgalicoccus psychrophilus* W713; K1, Kombination, Gesamtkonzentration 1×10^7 KBE/ml; K5, Kombination, Gesamtkonzentration 5×10^7 KBE/ml; Ktr, Kontrolle; L, *Lactococcus lactis* G121; Lb, *Lactobacillus curvatus*; S, *Staphylococcus sciuri* W620

Bereits von nicht-aktivierten Kokulturen (Ktr) werden gewisse Mengen IL-10 sezerniert (Abb.36). Mit Bezug auf diese Daten kann im Mittel für Kokulturen, die *J. psychrophilus*- oder die simultan stimulierten DCs (K1 und K5) enthalten, keine Zunahme der IL-10-Freisetzung verzeichnet werden. Deutlich größere Mengen an IL-10 als die, die bereits von den Kontroll-Zellen sezerniert werden, lassen sich nach Vorbehandlung der DCs mit *L. lactis* detektieren, aber auch unter Einfluss von *A. lwoffii*, *S. sciuri* und *Lb. curvatus* findet eine, wenn auch vergleichsweise geringe, Sekretion dieses Zytokins statt.

4 Diskussion

Eine Vielzahl von Studien belegt den allergieprotektiven Effekt, den das Aufwachsen in einer bauernhöflichen Umgebung mit sich bringt^{133,134,135,136,137,138} und unterstützt somit die bereits 1989 von David P. Strachan aufgestellte Hygienehypothese. Mittlerweile geht man davon aus, dass insbesondere der Kontakt zu Mikroorganismen, wie sie vermehrt in Tierställen vorkommen, dabei eine zentrale Funktion übernimmt. So konnten bereits mehrere Bakterienspezies mit einer Allergieprotektion assoziiert werden¹⁷⁰. Diese Mikrobenvermittelte Allergieprävention konnte für die drei Kuhstallisolale *Lactococcus lactis* G121, *Staphylococcus sciuri* W620 und *Acinetobacter Lwoffii* F78 bereits in verschiedenen Mausmodellen bestätigt¹⁵⁰ und die dahinter stehenden molekularen Mechanismen teilweise aufgeklärt werden¹⁴⁸. Darüber hinaus machen die aktuellen Studien von Ege *et al.* deutlich, dass der induzierte Allergieschutz umso stärker ist, je vielfältiger die mikrobielle Diversität ist, denen Bauernhofkinder ausgesetzt sind¹⁵⁵. In der vorliegenden Arbeit sollten die Mechanismen, die für diesen „Diversitätseffekt“ verantwortlich sein könnten, durch vergleichende Versuche („alleinige“ vs. „simultane Stimulation“) an humanen Immunzellen näher untersucht werden. Um ein möglichst großes Repertoire an zu untersuchenden Bakterien, beziehungsweise möglichst vielfältige Kombinationsmöglichkeiten zur Verfügung zu haben, sollten zunächst zwei weitere Kuhstallisolale, für die sich eine inverse Korrelation mit dem Vorkommen von Allergien und Asthma zeigte, hinsichtlich ihrer grundlegenden, immunmodulatorischen Eigenschaften untersucht werden: *Jeotgalicoccus psychrophilus* W713 (*J. psychrophilus*) und *Lactobacillus curvatus* (*Lb. curvatus*).

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten diese zwei Bakterien mit den bereits erforschten, protektiven Isolaten *L. lactis*, *A. Lwoffii* und *S. sciuri* in verschiedenen Varianten kombiniert werden und die Effekte, die sich durch alleinige vs. simultane Stimulation humaner Immunzellen ergeben, verglichen und hinsichtlich ihres allergieprotektiven Potentials eingeschätzt werden.

4.1 Die allergieprotektive Wirkung des Kuhstallisolats *Lactobacillus curvatus* basiert auf der Induktion einer T_{H1} -Polarisierung

Eine Stimulation humaner DCs mit dem Kuhstallisolat *Lb. curvatus* führte zu deren Reifung und Aktivierung. Diese zeigte sich anhand der Hochregulation der kostimulatorischen Oberflächenmoleküle CD80 und CD86, sowie der Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α (Abb.4, S.43), sowie CXCL8 (Daten nicht gezeigt). Wie sich im HEK-Transfektionssystem zeigte, findet die Zellaktivierung sowohl über den intrazellulären NOD2-Rezeptor (Abb.2, S.41) als auch über den an der Zelloberfläche lokalisierten TLR2 (Abb.3, S.42) statt. Allerdings lassen die Daten bezüglich des Aktivierungsstatus *Lb. curvatus*-stimulierter DCs vermuten, dass noch weitere Rezeptoren an der Zellaktivierung durch dieses Bakterium beteiligt sind. Denn obwohl sich in den NOD2- und TLR2-transfizierten HEK-Zellen nach *Lb. curvatus*-Stimulation im Vergleich (Positivkontrolle und *J. psychrophilus*) die geringste, an der CXCL8-Ausschüttung bemessene Aktivierung zeigte, führte die Stimulation huDCs zu einer vergleichsweise hohen Freisetzung der Zytokine IL-6, TNF- α und CXCL8. Gleichermaßen gilt für die Hochregulation der Oberflächenmoleküle CD80 und CD86. Anhand von ELISA-Messungen zeigte sich, dass die Behandlung huDCs zur Freisetzung des Zytokins IL-12p70 führt (Abb.6, S.46). Dieses ist bei der T_{H1} -Polarisierung aus mehreren Gründen von entscheidender Bedeutung: Zunächst induziert es die IFN- γ Produktion in den DCs selbst, dieses wiederum führt nach Bindung an naive T-Zellen durch JAK1- und JAK2-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT1 zur Expression des Transkriptionsfaktors T-bet¹⁷⁴. Die Expression dieses Moleküls war auch in *Lb. curvatus*-aktivierten Kokulturen eindeutig erhöht (Abb.9, S.49). Durch Bindung an die Promoterregion initiiert dieses TATA-Box-Bindeprotein sowohl die Produktion von IFN- γ , wodurch es aufgrund der autokrinen Wirkung von IFN- γ die eigene Expression stabilisiert, als auch die Expression des IL-12R auf naiven T-Zellen¹⁷⁵. Sobald dieser Rezeptor auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert wird, kann das von DCs freigesetzte IL-12p70 seine Wirkung auch auf die T-Zellen ausüben: über die Aktivierung von STAT3, STAT4 und NF- κ B verstärkt es die weitere Differenzierung von T_{H1} -Zellen und fördert neben der Produktion von IFN- γ die Freisetzung weiterer, T_{H1} -charakteristischer Zytokine^{174,174} wie TNF- α und IL-2^{176,177}. Auch von diesen Zytokinen ließen sich in *Lb. curvatus*-aktivierten Kokulturen erhöhte Mengen (IFN- γ und TNF- α , Abb.10, S.50) oder eine erhöhte mRNA-Expression (IL-2, Abb.9, S.49) nachweisen. Neben der indirekten Hochregulation des IL-12R auf naiven T-Zellen bewirkt IL-12p70 auch die verstärkte

Expression des IL-18R auf diesen Zellen. Die Bindung von IL-18 wiederum verstört in Synergie mit IL-12p70 die IFN--Produktion bereits differenzierter T_H1-Zellen¹⁷⁸. Neben aktivierte Makrophagen und Kupffer-Zellen wird dieses zur IL-1 Superfamilie gehörige Zytokin auch von DCs freigesetzt. Auch die Stimulation huDCs mit *Lb. curvatus* frte zu einer verstrteten Expression der IL-18-mRNA (Abb.27, S.79). Dieser Befund alleine ist aber nicht mit der Freisetzung dieses proinflammatorischen Zytokins gleichzusetzen, da dieses - ähnlich wie IL-1 - zunst als inaktive Proform sezerniert wird und erst durch Spaltung via Caspase-1 in seine bioaktive Form berfrt wird¹⁷⁹. Um eindeutig zu klären, ob auch IL-18 an der *Lb. curvatus*-induzierten T_H1-Polarisierung beteiligt ist, msten also weitere Versuche durchgefürt werden. Auch die mRNA-Expression von INF- wurde durch die Stimulation huDCs mit *Lb. curvatus* induziert (Abb.7, S.46). Für dieses Zytokin wurden sowohl inhibierende als auch rdernde Effekte auf die T_H1-Polarisierung beschrieben. Wie Nagai *et al.* zeigen konnten, ist der Zeitpunkt der IFN--Exposition entscheidend für den weiteren Verlauf der T-Zell-Polarisierung. So frt die Anwesenheit dieses Interferons wärend der Reifung huDCs zu Zellen, die im reifen Zustand die T_H1-Polarisierung rden und T-Zellen hervorrufen, die deutlich mehr IFN- sezernieren, als es T-Zellen vermogen, die durch DCs induziert worden sind, die in Abwesenheit von IFN- gereift sind. Ist IFN--hingegen wärend der primären Stimulation naiver T-Zellen durch DCs vorhanden, kommt es zu einer starken Inhibition der Entwicklung von T_H1-Zellen¹⁸⁰. Die Anwesenheit von IFN- wärend der Kokultivierung von *Lb. curvatus*-vorstimulierten DCs und naiven TCs wurde nicht berprt, dennoch lassen sich anhand der vorliegenden Daten folgende Vermutungen bezüglich der Rolle von IFN- bei der *Lb. curvatus*-induzierten T_H1-Polarisierung anstellen: Nach 20-stündiger Stimulation der DCs lässt sich eindeutig erkennen, dass eine Reifung stattgefunden hat (Abb.4, S.43 und Abb.5, S.44) und auch erst nach dieser Zeitspanne werden die DCs mit den naiven TCs kokultiviert. Die mRNA-Expression von INF- nach *Lb. curvatus*-Stimulation huDCs aber wies ihr Maximum bereits nach 6 h auf, weshalb davon auszugehen ist, dass dieses bereits wärend der Reifung der DCs in ausreichender Menge vorhanden war um eine T_H1-Polarisierung zu rsten. Für diese Annahme spricht auch die Tatsache, dass durch den starken T_H1-Induktor *L. lactis* eine ähnliche Kinetik der INF--mRNA-Expression- auf einem deutlich höheren Expressionsniveau- rkt wird.

Es zeigt sich also deutlich, dass die Behandlung huDCs mit dem Kuhstallisolat *Lb. curvatus* zur Induktion einer Vielzahl von T_{H1} -assozierten Molekülen führt. Nach dem T_{H1}/T_{H2} -Paradigma geht man davon aus, dass sich T_{H1} und T_{H2} -zellen gegenseitig in ihrer Entwicklung und Proliferation hemmen¹⁸¹. Die Entwicklung von T_{H1} -Zellen aus naiven TCs geht also einher mit einer Reduktion oder verminderten Proliferation von T_{H2} -Zellen, wobei diese gegenseitige Hemmung u.a. auf der gegenseitigen Antagonisierung der beiden linienspezifischen Transkriptionsfaktoren GATA3 und T-bet beruht¹⁷⁴. Diese reziproke Regulierung spiegelt sich in den vorliegenden Daten offensichtlich wieder und verdeutlicht die T_{H1} -induzierende Fähigkeit von *Lb. curvatus*: So war die T-bet-mRNA-Expression in den Kontroll-Kokulturen am geringsten (Abb.9, S.49), die Expression des Zinkfingerproteins GATA3 im Gegenzug dazu am stärksten hochreguliert (unter Einbezug der Datenstreuung, Abb.13, S. 54), nach *Lb. curvatus* Vorbehandlung der DCs hingegen ließ sich in den entsprechenden Kokulturen mit Bezug zur Mediumkontrolle ein leicht erhöhtes Expressionsniveau der T-bet-mRNA nachweisen, die GATA3-mRNA-Expression hingegen war im Vergleich zu den nicht aktivierten Kokulturen leicht herunterreguliert (unter Einbezug der starken Datenstreuung der Kontrollkulturen). Einhergehend mit dem geringen Vorhandensein von GATA3 in *Lb. curvatus*-aktivierten TCs ließ sich auch die mRNA der Zytokine IL-5 und IL-13 (Abb.12, S.53), beziehungsweise das Zytokin IL-4 (Abb.14, S.55) nur in sehr geringen Mengen nachweisen, denn die Expression dieser spezifischen T_{H2} -Zytokine wird sowohl auf Transkriptionsebene (Erhöhung der Promotoraktivität) als auch auf epigenetischer Ebene (Chromatin Remodelling) durch das Zinkfingerprotein reguliert^{182,183}. Auch wenn die zentrale Rolle von GATA3 bei der T_{H2} -Differenzierung unumstritten ist, so sind die molekularen Mechanismen der *in vivo* Entwicklung von T_{H2} -Zellen bisher nur wenig verstanden¹⁸⁴. Insbesondere die Frage, welchen Beitrag DCs zur Entwicklung von T_{H2} -Zellen beisteuern ist noch ungeklärt¹⁸⁵. Hinsichtlich der von DCs freigesetzten Zytokine werden IL-4 und IL-10 als T_{H2} -fördernd in Betracht gezogen¹⁸⁶. Verschiedene Publikationen zeigen aber, dass sowohl IL-4¹⁸⁷ als auch IL-10-defiziente DCs¹⁸⁸ immer noch eine T_{H2} -Antwort induzieren können. Zudem gehen zumindest einige Autoren davon aus, dass DCs gar nicht in der Lage sind, IL-4 zu produzieren¹⁸⁴ und dem regulatorischen Zytokin IL-10 wird mittlerweile vorrangig eine zentrale Rolle bei der Entstehung T_{reg} -Zellen zugesprochen¹⁸⁶. Oftmals wird auch das bloße Fehlen von IL-12p70 als Grund für die Entstehung von T_{H2} -Zellen angesehen¹⁸⁵. Vor diesem Hintergrund gewinnt die Beteiligung kostimulatorischer, T_{H2} -

polarisierender Moleküle zunehmend an Interesse. Neben den kostimulatorischen Ligand-Rezeptor-Paaren *inducible T-cell Co-stimulator* (ICOS)/ICOS-L und *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4)/CD80 oder CD86¹⁷⁴ werden auch Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie mit der T_H2-Polarisierung in Verbindung gebracht: OX-40/OX40-L¹⁸⁹ und die Notch-Liganden Jagged1 und Jagged2⁸⁷. Die mRNA-Expression von OX40-L und Jagged1 in huDCs nach Stimulation mit *Lb. curvatus* wurde auch in der vorliegenden Arbeit über einen Zeitraum von 12h bestimmt (Abb.11, S.51). Für den Notch-Liganden Jagged1 zeigte sich nach einer kurzzeitigen Zunahme der Expression (3 h) auf einen längeren Zeitraum (12 h) gesehen eine Abnahme gegenüber den unstimulierten DCs. Dieser Effekt der langfristigen Reduktion der mRNA-Expression von OX40-L konnte bereits nach Stimulation huDCs mit den Kuhstallisolaten *L. lactis*, *A. Iwoffii* und *S. sciuri* beobachtet werden. Inwieweit diese Herunterregulation auf mRNA-Ebene tatsächlich zu einer reduzierten Expression des Liganden auf der Oberfläche der Zellen führt, wurde bisher nicht überprüft, da aber die Vorbehandlung huDCs mit allen drei Bakterien zur Verringerung der nachweisbaren mRNA von GATA3 in Kokulturen führt, ist von einer geringeren Oberflächenexpression von Jagged1 auszugehen. Die Interaktion dieses Liganden mit Notch-Rezeptoren auf der Zelloberfläche von naiven TCs führt über eine intrazelluläre Signalkaskade und im Zusammenspiel mit bestimmten Koaktivatoren zur Genaktivierung von GATA3. Auch unter dem Einfluss von *Lb. curvatus* zeigte sich eine leichte Verringerung des Expressionsniveaus von GATA3, weshalb auch in diesem Falle trotz der erhöhten Werte nach 3 h nicht von einer ausschlaggebenden Expressionsverstärkung von Jagged1 auszugehen ist. Napolitani *et al.* beispielsweise konnten nach TLR-Stimulation moDCs über einen Zeitraum von 20 h zwar die mRNA von GATA3 nachweisen, das Protein selber war aber weder in entsprechenden Lysaten noch auf der Zelloberfläche detektierbar¹⁹⁰. Die mRNA des oftmals mit einer T_H2-Polarisierung assoziierten Liganden OX40-L hingegen ließ sich in *Lb. curvatus*-aktivierten Kokulturen auch nach 12 h in erhöhtem Maße nachweisen (Abb.11, S.51). Dennoch lässt sich dieser Befund mit einer verminderten T_H2-Antwort in Einklang bringen: zwar führt die OX40-Stimulation *in vivo* zur Produktion von IL-4 und begünstigt so die Entwicklung von T_H2-Zellen⁸⁹ und auch *in vitro* zeigte sich beispielsweise, dass OX40-defiziente Mäuse eine verminderte Fähigkeit zur Generierung von T_H2-Zellen aufweisen¹⁹¹, doch konnten andere Autoren zeigen, dass die Blockierung der OX40-OX40-L-Interaktion auch die Freisetzung T_H1-typischer Zytokine wie IFN-γ, IL-12p70 und TNF-α vermindert¹⁹². De Smidt *et al.* z.B. gehen davon aus, dass die

OX40-Kostimulation generell die Aktivierung naiver TCs verstört und zu einer Amplifikation des bereits induzierten Zytokinprofils frt⁸⁹.

Die Behandlung huDCs mit dem Kuhstallisolat *Lb. curvatus* frt also eindeutig zu einer T_H1-Polarisierung naiver TCs und vermindert die Entwicklung von T_H2-Zellen. Die zentrale Rolle übernimmt hierbei das von DCs sezernierte IL-12p70. Gleichzeitig bewirkt die *Lb. curvatus*-Stimulation aber auch die Sezernierung des immunregulatorischen IL-10 (Abb.15, S.56). Dieses kann von IL-12p70 induziert werden¹⁹³ und in Verbindung mit weiteren Faktoren zur Induktion von T_{reg}-Zellen fren. In *Lb. curvatus*-aktivierten Kokulturen ließ sich im Vergleich zu nicht aktivierten Kokulturen keine Zunahme der mRNA-Menge des T_{reg}-spezifischen Transkriptionsfaktors FoxP3 feststellen, (Abb.15, S.56), weshalb zumindest die Induktion natürlich vorkommender, im Thymus entstehenden FoxP3⁺-T_{reg} (nT_{reg}) eindeutig ausgeschlossen werden kann. Da TGF- essentiell für die Induktion von FoxP3 ist¹⁹⁴, ließ sich die unveränderte FoxP3-Expression mit einer geringen oder fehlenden Sekretion von TGF- aufgrund einer stark verminderten mRNA-Expression nach *Lb. curvatus* Stimulation huDCs begrünen (Abb.15, S.56). Allerdings wurde bis heute eine Vielzahl FoxP3⁻-T_{reg}-beschrieben¹⁹⁵, beispielsweise T_r1- und T_H3-Zellen¹⁹⁶. Anders als die nTreg entwickeln sich diese Subpopulationen durch Antigen-Präsentation gegenüber DCs in der Peripherie aus naiven TCs¹⁹⁷ und zeichnen sich durch die Freisetzung von IL-10 aus¹⁸. Dieses ließ sich vermehrt auch im Überstand von TCs nachweisen, die mit *Lb. curvatus*-behandelten DCs kokultiviert wurden (Abb.36, S.91). Wrend aber T_H3-Zellen nur geringe Mengen dieses Zytokins und vorrangig TGF- sezernieren¹⁸³, setzen T_r1-Zellen große Mengen von IL-10 und kaum¹⁹⁸, oder gar kein¹⁹⁶ TGF- frei. In Kokulturen, die unter Einfluss des *Lb. curvatus* entstanden sind, zeigte sich keine Zunahme der TGF--mRNA-Expression gegenüber den Kontrollkulturen (Abb.15, S.56), folglich wäre davon auszugehen, dass es sich eher um T_r1- als um T_H3-Zellen handelt. Da bei der Differenzierung letzterer TGF- eine große Rolle spielt¹⁹⁹, spricht auch das bereits erwhte, verminderte Expressionslevel der mRNA dieses Faktors nach Behandlung von huDCs mit *Lb. curvatus* für das Vorhandensein von T_r1-Zellen. Gleichzeitig ließen sich in den Überständen so behandelter DCs leicht erhöhte Mengen von IL-10 nachweisen (Abb.15, S.56). ber die *in vitro* Generierung T_r1-Zellen aus naiven TCs durch anhaltende TCR-Stimulation -wie sie bei 5-tiger Kokultur huDCs und TC gegeben ist- unter Anwesenheit von IL-10, welches nachweislich von *Lb. curvatus*-behandelten DCs sezerniert wird- wurde bereits mehrfach berichtet¹⁹⁸, somit liegt ein weiteres Argument für

die Entstehung von T_r1-Zellen unter Einfluss des Kuhstallisolats *Lb. curvatus* vor. Mittlerweile ist aber bekannt ist, dass nahezu jede TC-Subpopulation, darunter T_H1- und T_H2-Zellen, gewisse Mengen von IL-10 freisetzen kann¹⁹⁵, weshalb sich noch weitere mögliche Erklärungen für das Vorhandensein erhöhter IL-10-Mengen in Kokulturen, die unter Einfluss des *Lb. curvatus* entstanden sind, ergeben. Da sich keine Hinweise für die Existenz von T_H2-Zellen in den Kokulturen fanden (s.o.), sich aber eindeutig eine Entwicklung von T_H1-Zellen zeigte, könnte also auch diese Effektorgruppe von T_H-Zellen als Quelle des immunregulatorischen Zytokins infrage kommen. In der Tat werden in der Literatur häufig Zellen beschrieben, die sowohl große Mengen des T_H1-Zytokins IFN-γ als auch von IL-10 freisetzen¹⁹³. Diese entstehen *in vitro* unter genau den Umständen, die auch im vorliegenden System gegeben sind: So ist die Anwesenheit von IL-12p70 während der Differenzierung unbedingt notwendig (Abb.6, S.46), die Präsenz von IL-4 (Abb.14, S.55) hingegen verhindert die IL-10-Produktion durch T_H1-Zellen²⁰⁰. Zudem ist der Notch-Ligand DLL4 an dem Prozess der IL-10-Induktion in T_H1-Zellen beteiligt²⁰¹, eine weitere Bedingung, die auch durch *Lb. curvatus*-Stimulation huDCs erfüllt wird (Abb.8, S.47). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Behandlung huDCs mit dem Kuhstallisolat *Lb. curvatus* zur Induktion verschiedener, T_H1-polarisierender Moleküle führt. Damit einhergehend zeigten sich auch in den entsprechenden Kokulturen Faktoren, die auf das Vorhandensein von T_H1-Zellen hindeuten. Konform mit diesen Befunden zeigte sich keine Zunahme, beziehungsweise eine leichte Abnahme T_H2-zellspezifischer Marker. Ob sich unter Einfluss des Bakteriums auch T_r1-Zellen entwickeln, ließe sich nur durch weiterführende Versuche klären. Die *Lb. curvatus*-induzierte Immunreaktion unterstützt die Hygienehypothese also eher im Sinne einer T-Zell-Polarisation zu Gunsten der T_H1-Zellen, denn im Sinne einer induzierten Immunsuppression (siehe 1.8.3, S. 25).

4.2 Das Kuhstallisolat *Jeotgalicoccus psychrophilus* W713 induziert keine eindeutige T_H -Polarisierung

Im Gegensatz zum *Lb. curvatus* führte die Behandlung huDCs mit dem Isolat *J. psychrophilus* zu keiner eindeutigen Polarisation naiver TCs. Obwohl sich nur Spuren des zentralen T_H1 -polarisierenden Zytokins IL-12p70 in den Überständen *J. psychrophilus*-behandelter DCs fanden (Abb.6, S.46), ließen sich in den entsprechenden Kokulturen Hinweise auf das Vorhandensein von T_H1 -Zellen finden. So war die Hochregulation der mRNA des T_H1 -spezifischen Transkriptionsfaktors T-bet und auch die des T_H1 -Zytokins IL-2 in Kokulturen nach Prä-Inkubation huDCs mit *J. psychrophilus* vergleichbar mit der durch *Lb. curvatus* bewirkten Steigerung (Abb.9, S.49). Die Freisetzung der ebenfalls T_H1 -assoziierten Zytokine TNF- α und IFN- γ hingegen war vergleichsweise etwas geringer (Abb.10, S.50). Dies ist im Einklang mit der deutlich geringeren Sezernierung des T_H1 -induzierenden IFN- β (Abb.7, S.46) und der geringeren (ICAM), beziehungsweise fehlenden (DLL4) Induktion T_H1 -polarisierender, kostimulatorischer Moleküle (Abb.8, S.47). Auch für die Entwicklung von T_H2 -Zellen durch Behandlung huDCs mit *J. psychrophilus* lassen sich einige Hinweise in den vorliegenden Daten finden. So war die mRNA der typischerweise von T_H2 -Zellen sezernierten Zytokine IL-5 und IL-13 in den entsprechenden Kokulturen in einigen Spendern im Vergleich zu unbehandelten Kulturen deutlich hochreguliert (Abb.12, S.53). Die Expression des Transkriptionsfaktors GATA3 ist essentiell für die Induktion dieser Zytokine¹⁸². Aufgrund der medianen, geringeren Expression dieses Moleküls (mit Bezug zu den Kontroll-Kulturen) mag dies zunächst widersprüchlich erscheinen (Abb.13, S.54), allerdings wird bei Betrachtung der Daten der einzelnen Spender deutlich, dass genau in den Kulturen erhöhte mRNA-Werte der Zytokine nachgewiesen wurden, in denen auch eine leicht erhöhte GATA3-Expression detektierbar war. Das ebenfalls T_H2 -spezifische Zytokin IL-4 hingegen konnte auch unter Einfluss des *J. psychrophilus* nur in geringsten und im Vergleich zu unbehandelten Zellen nicht erhöhten Mengen nachgewiesen werden (Abb.14, S.55). Ähnlich wie unter Einfluss von *Lb. curvatus* kann auch nach *J. psychrophilus*-Behandlung huDCs die Induktion von FoxP3⁺- T_{reg} ausgeschlossen werden. Nicht nur aufgrund der im Median kaum erhöhten Expression der mRNA dieses Transkriptionsfaktors (Abb.16, S.57), sondern auch wegen der reduzierten mRNA-Expression des für die Induktion FoxP3⁺- T_{reg} essentiellen TGF- β (Abb.15, S.56). Allerdings ist auch in diesem Falle die Entwicklung von T_{H1} -Zellen oder IL-10-produzierenden T_H1 -Zellen nicht auszuschließen.

Auf Basis der vorliegenden Daten lässt sich also die vermeintliche Allergieprotektion, die durch dieses Bakterium vermittelt wird, nicht anhand der zwei gängigen Mechanismen des induzierten Allergieschutzes („Immunpolarisierung zu Gunsten von T_H1-Zellen“ und „induzierte Immunsuppression“) erklären. Da es sich bei den von Ege *et al.* erhobenen Daten um mathematische Korrelationen und nicht um experimentelle Daten handelt, bleibt die Frage, ob dieses Kuhstallisolat *in vivo* tatsächlich zur Prävention der Ausbildung eines asthmatischen Phänotyps führt.

4.3 Synergistische Effekte sind nicht verantwortlich für die erhöhte Allergieprotektion, die durch eine höhere Anzahl von Mikroben induziert wird

4.3.1 Die simultane Stimulation huDCs mit den drei allergieprotektiven Kuhstallbakterien *Lactococcus lactis* G121, *Acinetobacter Iwoffii* F78 und *Staphylococcus sciuri* W620 führt nur teilweise zu einer synergistischen Zytokinfreisetzung

Die Studien von Ege *et al.* zeigen eine deutliche Korrelation zwischen der Höhe des induzierten Allergieschutzes und der mikrobiellen Diversität, denen Bauernhofkinder durch ihre Umgebung ausgesetzt sind¹⁵⁵. Es wird also angenommen, dass nicht einzelne Strukturen den allergieprotektiven Effekt der Bauernhofumgebung vermitteln, sondern, dass die Kombination unterschiedlicher Mikroorganismen, die zu einer vielfältigen Aktivierung des Immunsystems führen, verantwortlich ist. Da die dahinterstehenden Mechanismen bisher noch unerforscht sind, sollten diese in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden. Eine mögliche Erklärung für eine verstärkte Allergieprotektion durch höhere mikrobielle Vielfalt könnten synergistische Effekte in Bezug auf die immunregulatorischen Mechanismen, die eine Allergieprävention induzieren, sein. Bereits Jennifer Debarry stellte im Zuge ihrer Dissertation fest, dass in Bezug auf die IL-12p70-Freisetzung huDCs ein Synergismus zwischen den beiden allergieprotektiven Kuhstallisolaten *L. lactis* und *A. Iwoffii* besteht¹⁷³. Diese Beobachtung gab Anreiz, diese Hypothese weiter zu verfolgen und im Rahmen meiner Masterarbeit konnte ich für eine Vielzahl von 2er-Kombinationen der drei Bakterien *L. lactis*, *A. Iwoffii* und *S. sciuri* synergistische Effekte bei der Freisetzung der zentralen, teilweise T-Zell-polarisierenden Zytokine IL-10, IL-12p70, IL-6 und TNF- α nachweisen²⁰².

Aus diesem Grund bestand der erste Schritt der vorliegenden Arbeit darin, die Freisetzung verschiedener Zytokine nach Stimulation huDCs mit verschiedenen 3er-Kombinationen dieser drei Bakterien zu untersuchen. Ähnlich, wie es sich auch schon bei den Daten der Masterarbeit abzeichnete, ließ sich auch nach Stimulation von huDCs mit 3er-Kombinationen erkennen, dass die Ausprägung der verschiedenen Effekte jeweils Zytokin-spezifisch ist. Allerdings zeigten sich deutlich seltener synergistische Effekte als es nach simultaner Stimulation mit nur zwei Bakterien der Fall war. So ließ sich eine synergistische Freisetzung nach simultaner Stimulation mit *L. lactis*, *A. Iwoffii* und *S. sciuri* nur für einige wenige Ausnahmen in Bezug auf IL-6 und IL-12p70 beobachten, hinsichtlich der TNF- α - und IL-10-Freisetzung hingegen waren gar keine synergistischen Effekte zu verzeichnen. Diese Beobachtung lässt zunächst wie folgt erklären: mit Ausnahme von IL-12p70 wird jedes dieser vier Zytokine ab einer bestimmten Konzentration von jedem der verwendeten Bakterien induziert. Gerade bei Stimulationen mit hohen Konzentrationen bedeutet dies, dass sehr hohe Zytokinmengen freigesetzt werden müssten, um von einem synergistischen Effekt ausgehen zu können. Tatsächlich aber hat jede Zelle ab einem bestimmten Punkt ihre maximale Sekretionskapazität erreicht, so dass eine stärkere Freisetzung biologisch gar nicht möglich wäre. Folglich wären synergistische Effekte, wenn überhaupt, nach Stimulationen mit Kombinationen mit niedrigen bakteriellen Konzentrationen zu erwarten. Tatsächlich konnten nach DC-Stimulationen mit Gemischen, die niedrige Konzentrationen (10^4 oder 10^5 KBE/ml) von mindestens zwei der Bakterien enthielten, fast immer Zytokinmengen detektiert werden, die zumindest einer rein additiven Freisetzung entsprechen, wobei IL-12p70 und IL-6 diesbezüglich teilweise Ausnahmen bilden. IL-6 in dem Sinne, dass oben genannte Kombinationen häufig sogar zu einer synergistischen Freisetzung führen (z.B. Kombination aus 10^6 oder 10^7 KBE/ml *L. lactis* + 10^4 oder 10^5 KBE/ml *A. Iwoffii* und *S. sciuri* (Abb.22, S.71) oder 10^6 KBE/ml *A. Iwoffii* + 10^6 KBE/ml *S. sciuri* und *L. lactis* (Abb.38, S.133). Eine additive IL-12p70-Freisetzung hingegen ließ sich nur nach Stimulation von huDCs mit Kombinationen erkennen, für die niedrige Konzentrationen von *L. lactis* und *A. Iwoffii* (Abb.38, S.133)/ *S. sciuri* und *A. Iwoffii* (Abb.21, S.66) mit 10^5 oder 10^6 KBE/ml des jeweils dritten Bakteriums vereint wurden. Gemische, bei denen die *S. sciuri* und *L. lactis*-Konzentrationen jeweils gleich waren und die des *A. Iwoffii* variiert wurden, führten grundsätzlich zu einer IL-12p70-Sekretion, die deutlich geringer als eine rein additive ist. Als auffällig erwies sich, dass hohe Konzentrationen des *S. sciuri* in Verbindung mit 10^4 - 10^6

KBE/ml *A. Iwoffii* und *L. lactis* zu einer synergistischen IL-12p70-Freisetzung führten, obwohl *S. sciuri* selbst gar kein IL-12p70 induziert. Da die IL-12p70-Sezernierung mit zunehmender *L. lactis*- (und *A. Iwoffii*-) Konzentration stieg, ist davon auszugehen, dass dieser Effekt durch den starken IL-12p70-Induktor *L. lactis* vermittelt wird. Wurden hingegen 10^7 KBE/ml des *A. Iwoffii* in Kombination mit 10^4 - 10^6 KBE/ml *L. lactis* und *S. sciuri* zur Stimulation verwendet, war die Zytokinfreisetzung sogar inhibiert. Aus diesem Grunde ließe sich vermuten, dass mittlere bis hohe *A. Iwoffii*-Konzentrationen (10^5 - 10^7 KBE/ml) die *L. lactis*-vermittelte IL-12-Freisetzung inhibieren (vgl. IL-12-Freisetzung nach Stimulation mit 10^6 oder 10^7 KBE/ml *A. Iwoffii* + variierende *L. lactis* –und *S. sciuri*-Konzentrationen). Dieser inhibierende Effekt war aber nicht erkennbar, wenn gleichzeitig *S. sciuri* in höheren oder der gleichen Konzentrationen vorlag wie der *A. Iwoffii* (wie es bei den Kombinationen *S. sciuri* 10^6 oder 10^7 KBE/ml + 10^4 - 10^6 KBE/ml der anderen zwei Bakterien der Fall ist). Da sowohl *S. sciuri* als auch *A. Iwoffii*, nicht aber *L. lactis*, für die Erkennung außerhalb der Zelle auf den TLR2 angewiesen sind, könnte sich eine Kompetition um die vorhandenen Rezeptoren ergeben. Sofern höhere Konzentrationen von *S. sciuri* als von *A. Iwoffii* vorliegen, besteht für Ersteren eine höhere Bindungswahrscheinlichkeit. So könnte es zu einer aktiven Unterbindung der inhibierenden, *A. Iwoffii*-vermittelten Effekte kommen und sich somit ein Wirkungsvorteil für den *L. lactis* ergeben. Intrazellulär vermitteln alle drei Bakterien ihre Wirkung durch den Rezeptor NOD2, da *L. lactis* sich aber zusätzlich des TLR8 bedient¹⁵¹, wäre denkbar, dass die Wirkung dieses Bakteriums auch aufgrund einer intrazellulären Konkurrenz zwischen *S. sciuri* und *A. Iwoffii* weniger stark/negativ beeinflusst wird. Auch wenn sich bezüglich dieser Kombinationen (hohe *S. sciuri*-Konzentrationen in Verbindung mit 10^4 - 10^6 KBE/ml *A. Iwoffii* und *L. lactis*) eine synergistische IL-12p70-Freisetzung zeigte, so wurden durch diese dennoch nicht die insgesamt höchsten, induzierbaren IL-12p70-Level freigesetzt. Diese ließen sich nach Behandlung huDCs mit Gemischen, die hohe Konzentrationen von *L. lactis* und nur geringe Mengen der anderen zwei Bakterien enthielten, detektieren (Abb.21, S.66). Bei Betrachtung dieses Datensatzes wird nochmals besonders deutlich, dass die *L. lactis*-vermittelte Zytokininduktion stark von der Anwesenheit weiterer Bakterien beeinflusst wird. So nimmt die gemessene IL-12p70-Freisetzung bei gleichbleibender, hoher *L. lactis*-Konzentration mit zunehmender Konzentration der anderen zwei Bakterien deutlich ab. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte der Wirkmechanismus des *L. lactis* liefern. Wie sowohl Jennifer Debarry als auch Karina Stein in ihren Dissertationen zeigen

konnten^{173,151}, weisen die *L. lactis*-vermittelten Effekte im Vergleich zu den *S. sciuri*- und *A. Iwoffii*-induzierten eine deutliche Zeitverzögerung auf. Dies ist in der Tatsache begründet, dass die Aufnahme dieses Isolates und auch die endosomale Ansäuerung essentiell für die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, insbesondere von IL-12p70, sind. Liegen also von allen drei Bakterien gleich hohe Konzentrationen vor, ist die Wahrscheinlichkeit der Erkennung durch die Zelle von außen für *S. sciuri* und *A. Iwoffii* erhöht, da diese im Gegensatz zum *L. lactis* nicht nur durch Aufnahme durch die Zelle sondern auch über Rezeptoren auf der Zelloberfläche (TLR2, TLR4) erkannt werden können. Zudem können sie so bereits deutlich vor dem *L. lactis* ihre spezifische Geneexpression induzieren. Da die DCs so bereits voraktiviert sind, wäre es denkbar, dass *L. lactis* gar nicht erst von der Zelle erkannt wird. Möglich wäre aber auch, dass dessen Erkennung nicht in dem Maße zu einer Aktivierung führt, wie es ohne diese vorangegangene Aktivierung möglich wäre, beispielsweise aufgrund eines Mangels intermediärer Signalmoleküle.

Des Weiteren fiel auf, dass die Stimulation mit der höchsten, verwendeten Bakterienkonzentration (3×10^7 KBE/ml) zu einer eindeutigen Inhibierung der (*L. lactis*-induzierten-) IL-12p70-Freisetzung führte, es wurden lediglich noch Zytokinmengen detektiert, die gerade einmal einem Zwanzigstel der Menge entsprechen, die alleine durch den *L. lactis* induziert werden. In geringerem Maße ließen sich diese Tendenzen auch in Bezug auf die anderen zwei analysierten, proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α erkennen, wobei die Inhibierung hier nicht ganz so stark ausgeprägt war und Zytokinmengen ermittelt wurden, die zumindest im gleichen Bereich lagen wie die, die durch Behandlung der Zellen mit dem jeweils am schwächsten induzierenden Bakterium alleine erreicht wurden. Dieser Effekt ließe sich mit einer generellen „Hyperstimulation“ der DCs erklären, die zu sogenannter „exhausted“ DCs führen kann (siehe folgenden Abschnitt).

Für das immunregulatorische Zytokin IL-10 hingegen ergab sich ein vollkommen anderes Induktionsprofil, es zeigten sich für fast alle ausgetesteten Kombinationsmöglichkeiten der drei Bakterien additive Effekte. Lediglich nach Überschreiten einer Gesamtbakterienlast von 2×10^7 KBE/ml wurden Zytokinmengen gemessen, die deutlich geringer waren, als die, die durch rein additive Effekte hätten induziert werden müssen. Auch in diesem Kontext ließe sich diese Beobachtung aufgrund der Tatsache erklären, dass die Einzelstimulation huDCs mit allen drei Bakterien ab einer bestimmten Konzentration zur Freisetzung von IL-10 führt und das Gesamtniveau an Zytokin, das produziert werden müsste, um einer additiven Menge

zu entsprechen, von den Zellen gar nicht erreicht werden kann. Dennoch ließen sich nach Stimulation mit der maximalen, verwendeten Gesamtbakterienlast (3×10^7 KBE/ml) die höchsten IL-10-Level messen. Das Zytokinprofil, welches unter Einfluss sehr hoher, bakterieller Konzentrationen entstanden ist, ist charakteristisch für sogenannte „exhausted“ DCs. Diese ausgereiften DCs zeichnen sich durch die Produktion großer IL-10-Mengen und eine supprimierte IL-12p70-Freisetzung aus, während die IL-6- und TNF- α -Sezernierung hingegen aufrecht erhalten bleibt²⁰³. In diesem Falle wäre die IL-12p70-Inhibition IL-10 abhängig²⁰⁴. Da sich aber keine direkte, negative Korrelation der freigesetzten IL-12p70- und IL-10-Mengen zeigte (beispielsweise induzierte die Behandlung der Zellen mit 1×10^7 KBE/ml *S. sciuri* in Kombination mit 10^6 KBE/ml der anderen zwei Bakterien ein vergleichsweise hohes Niveau an IL-12p70, gleichzeitig ließ sich aber auch eine große Menge von IL-10 nachweisen), lässt sich nur anhand der vorliegenden Daten nicht eindeutig feststellen, ob die beobachtete Zytokininhibierung tatsächlich IL-10-vermittelt ist, oder ob diese aufgrund einer Überschneidung der Signalwege, die zur Induktion der proinflammatorischen Zytokine führen, zustande kommt.

Die Ergebnisse der simultanen Stimulation huDCs mit verschiedenen Kombinationen der drei Kuhstallisolate lassen sich wie folgt zusammenfassen: Es zeigten sich sowohl inhibierende, additive und selten auch synergistische Effekte in Bezug auf die Freisetzung der vier Schlüsselzytikine IL-6, IL-12p70, TNF- α und IL-10. Für jedes dieser analysierten Zytokine zeigte sich zwar ein vollkommen individuelles Induktionsmuster, dennoch ließen sich in Bezug auf die Freisetzung der drei proinflammatorischen Zytokine im Vergleich zu dem antiinflammatorischen Zytokin IL-10 gleiche Tendenzen erkennen. Während sich eine sehr hohe Gesamtbakterienlast auf die Produktion der ersten drei eher inhibierend auswirkte, induzierte diese im Vergleich zu den Einzelstimulationen eine deutlich erhöhte IL-10-Freisetzung. Es zeichnete sich ab, dass hohe Konzentrationen des Gram-positiven Bakteriums *L. lactis* in Verbindung mit niedrigen Konzentrationen des ebenfalls Gram-positiven Isolats *S. sciuri* und dem Gram-negativen *A. Iwoffii*, meist zu den höchsten, nach simultaner Stimulation gemessenen Zytokinemengen führte, wobei auch diese Beobachtung nur auf die drei inflammatorischen Zytokine, nicht aber auf IL-10, zutrifft. Darüber hinaus ließen sich aber keine Korrelationen zwischen der Verwendung oder dem eingesetzten Verhältnis Gram-positiver und –negativer Bakterien erkennen.

4.3.2 Die simultane Stimulation huDCs mit fünf allergieprotektiven Kuhstallbakterien führt zu einem im Vergleich zu den Einzelstimulationen vollkommen anderen Induktionsprofil

Die Tendenzen, die sich bereits nach Stimulation huDCs mit 3er-Kombinationen der Kuhstallbakterien *L. lactis*, *A. Iwoffii* und *S. sciuri* hinsichtlich der Freisetzung der Zytokine IL-10, IL-12p70, IL-6 und TNF- α abzeichneten, ließen sich nach simultaner Stimulation mit dem um *Lb. curvatus* und *J. psychrophilus*-erweitertem Gemisch noch deutlicher erkennen: Auch hier zeigte sich in Bezug auf die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 TNF- α und IL-12p70, dass sich eine zu hohe Gesamtbakterienlast stark inhibierend auf die Sekretion auswirkt. In Bezug auf die Freisetzung von IL-6 (Abb.22, S.71) und TNF- α (Abb.23, S.72) ließ sich eine eindeutige Konzentrationsabhängig erkennen; so war die durch simultane Stimulation induzierte, maximale Zytokinmenge je nach Stimulation mit 5×10^6 KBE/ml detektierbar, höher konzentrierte Behandlungen führten zu einer geringeren Freisetzung. Während durch Behandlung der DCs mit 5×10^5 KBE/ml mindestens noch die Menge an Zytokin freigesetzt wurde, die durch das jeweils am stärksten induzierende Bakterium in entsprechender Konzentration alleine induziert wurde, galt dies nicht für die höher konzentrierten Gemische. Wie sich bereits nach Stimulation von huDCs mit den 3er-Kombination abzeichnete, waren die inhibierenden Effekte auch nach Verwendung des 5er-Gemisches in Bezug auf die Freisetzung des Zytokins IL-12p70 (Abb.21, S.66) am stärksten ausgeprägt: erneut ließ sich eine konzentrationsabhängige Induktion erkennen, wobei das simultan induzierbare Maximum der IL-12p70-Sekretion (durch 5×10^5 KBE/ml und 1×10^6 KBE/ml) nur einem Bruchteil dessen entsprach, was alleine durch die beiden starken Induktoren *L. lactis* und *S. sciuri* induziert werden konnte. Nach Stimulation der Zellen mit 5×10^7 KBE/ml des Gemisches war die Inhibierung sogar so stark, dass kein freigesetztes IL-12p70 mehr messbar war.

Beim Abgleich mit den Daten, die den 3er-Stimulationen entstammen, wird deutlich, dass die Freisetzung der drei proinflammatorischen Zytokine nicht nur von der verwendeten Gesamtbakterienzahl abhängig zu sein scheint, sondern dass auch die Anzahl der verwendeten Bakterien eine Rolle spielen könnte. Dies lässt sich beispielsweise am Verlauf der gemessenen IL-6-Freisetzung nach simultaner Stimulation mit drei (Abb.18, S.61 und Abb.38, S.133) oder fünf Bakterien (Abb.22, S.71) erkennen: Die detektierbaren Mengen nahmen zunächst mit steigender Gesamtbakterienlast zu (1×10^5 - 3×10^6 KBE/ml, entspricht:

Diskussion

1×10^5 , 3×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 3×10^6 KBE/ml) und sanken mit weiter zunehmender Konzentration wieder (5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 KBE/ml). In diesen konzentrationsabhängigen Verlauf passen aber nicht die IL-6-Mengen, die sich nach Behandlung der DCs mit $1,2 \times 10^7$ oder 3×10^7 KBE/ml (3er-Kombinationen) feststellen ließen, da diese deutlich höher waren als jene, die durch Stimulation mit 1×10^7 und 5×10^7 KBE/ml (5er-Kombinationen) bewirkt wurden. Im Kontext der IL-6-Daten wird dies besonders bei hohen *L. lactis*-Konzentrationen deutlich und auch hinsichtlich der IL-12p70-Freisetzung zeigten sich diese Effekte besonders deutlich unter Beteiligung hoher *L. lactis*-Konzentrationen. Für die TNF- α -Sekretion hingegen zeigten sich diese Effekte nur nach Behandlung der DCs mit Kombinationen, die hohe *L. lactis*-Konzentrationen enthielten.

Wie sich bereits bei Betrachtung der Daten hinsichtlich der Zytokinfreisetzung nach Stimulation mit verschiedenen 3er-Kombinationen erkennen ließ, zeigt IL-10 ein ganz anderes Induktionsprofil, welches sich nach Behandlung von huDCs mit 5er-Kombinationen der allergieprotektiven Bakterien noch deutlicher abzeichnete: In diesem Fall induzierte die höchste verwendete Konzentration des 5er-Gemisches (5×10^7 KBE/ml) auch das höchste, simultan erreichbare Zytokinniveau (Abb.25, S.75). Dieses entspricht zwar nicht der Menge, die durch rein additive Induktion hätte erreicht werden können, dennoch ist es im Gegensatz zu den freigesetzten Mengen der proinflammatorischen Zytokine deutlich höher als das, welches durch eines der Bakterien alleine (auch jeweils des stärksten Induktors) freigesetzt wird. Allerdings entspricht die zur Stimulation verwendete Konzentration mit 5×10^7 KBE/ml auch der fünffachen Konzentration wie der für die Einzelstimulationen verwendeten. Berücksichtigt man also diese Gesamtbakterienlast und vergleicht die IL-10-Mengen, die durch 1×10^7 KBE/ml von je einem der Bakterien induziert wurden, mit denen, die durch insgesamt 1×10^7 KBE/ml des 5er-Gemisches freigesetzt wurden, so verliert diese Aussage ihre Gültigkeit, da die simultan induzierten Mengen nicht so hoch sind, wie jene, die beispielsweise durch gleiche Konzentrationen des *A. Iwoffii* oder *S. sciuri* alleine erreicht wurden. Das regulatorische Zytokin IL-10 ist auch das einzige der analysierten Zytokine, für dessen Induktion sich eine reine Abhängigkeit der Gesamtbakterienlast ohne Zusammenhang zwischen der Anzahl der zur Stimulation verwendeten Bakterien zeigt. So zeigt sich auch unter Einbezug der Daten der 3er-Stimulationen eine rein konzentrationsabhängige Steigerung der sezernierten IL-10-Mengen. Ausnahmen diesbezüglich bilden jeweils nur die 3er-Gemische, die 10^7 KBE/ml *A. Iwoffii* und *L. lactis* in

Kombination mit 10^4 bis 10^6 KBE/ml *S. sciuri* enthielten, da nach Behandlung der DCs mit diesen Kombinationen trotz höherer Gesamtbakterienlast ($2,001\text{--}2,1 \times 10^7$ KBE/ml) IL-10-Level gemessen wurden, die geringer waren als jene, die nach Stimulation mit Gemischen, die 10^7 KBE/ml *S. sciuri* und 10^4 bis 10^6 KBE/ml *L. lactis* und *A. Iwoffii* (also eine Gesamtbakterienlast von $1,002\text{--}1,2 \times 10^7$ KBE/ml) enthielten, detektiert wurden. Auch in diesem Kontext lässt sich nur spekulieren, ob alleine eine (zu) hohe Gesamtbakterienlast für die Zytokinproduktion fördernde (IL-10) oder inhibierende (IL-6, IL-12p70 und TNF- α) Wirkung verantwortlich ist, oder ob vielmehr die hohen Level des immunsupprimierenden IL-10 für die inhibierte Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine verantwortlich ist. Denn aus der Literatur ist bekannt, dass IL-10 ein potenter Inhibitor der Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine ist. Darunter sind nicht nur TNF- α , IL-6 und besonders IL-12p70, sondern auch die Zytokine IL-18 und IFN- β ²⁰⁵, deren mRNA-Expression in der vorliegenden Arbeit analysiert wurde (Abb.27, S.79) und ebenfalls eine Reduktion im Vergleich zu den Einzelstimulationen aufweist. Tatsächlich zeigte sich in diesem Kontext im Gegensatz zu den Stimulationen mit den 3er-Kombinationen eine inverse Korrelation zwischen den gemessenen IL-10- und IL-12p70-Mengen. IL-10 unterdrückt aber nicht nur über einen autokrinen Mechanismus die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine durch DCs, sondern übernimmt darüber hinaus in Abwesenheit von IL-12p70 und anderen proinflammatorischen Zytokinen, wie sie vorliegend gegeben ist, eine immunsuppressive Wirkung, die die Entstehung großer Mengen Effektor-T-Zellen verhindert²⁰⁶. Tatsächlich waren auch nahezu alle analysierten Parameter, die mit einer T-Zell-Polarisierung assoziiert sind, im Vergleich zu den Einzelstimulationen nach simultaner Stimulation mit 1 oder 5×10^7 KBE/ml deutlich reduziert (Ausnahmen CD80, CD86, TGF- β -mRNA in Kokulturen), unabhängig davon, ob es sich um T_H1-, T_H2- oder T_{reg}-assoziierte Moleküle handelte. Auch diesbezüglich ließe sich ein Zusammenhang zwischen der Höhe der gemessenen IL-10-Mengen und der Stärke der Reduzierung der gemessenen Parameter herstellen, da diese mit einer einzigen Ausnahme (DLL4) nach Behandlung der Zellen mit 5×10^7 KBE/ml stets deutlich stärker ausgeprägt war (CD80, CD86, IL-18, IFN- β , ICAM-1, Jagged-1) als es nach Stimulation mit 1×10^7 KBE/ml der Fall war, oder die Moleküle zumindest gleich stark, nicht aber stärker, induziert waren (CD86, IFN- γ , TNF- α , OX40-L, TGF- β , IL-1 β). Folglich ließ sich im Vergleich zu den Einzelstimulationen nur eine leichte, oder keine eindeutige T-Zell-Polarisierung feststellen. So zeigte sich eine im Vergleich zu den Einzelstimulationen nur eine leicht, aber

mit Bezug zur Mediumkontrolle dennoch erhöhte, mRNA-Expression der zwei T_{H1} -assoziierten Moleküle T-bet und IL-2 (Abb.29, S.81) in TCs messen, die mit simultan vorstimulierten DCs kokultiviert wurden. Auch die detektierten Mengen der von T_{H1} -Zellen freigesetzten Zytokine IFN- γ und TNF- α (Abb.30, S.83) waren im Vergleich reduziert, lagen aber über dem Kontroll-Niveau. Zu begründen wäre dies mit der ebenfalls stark reduzierten mRNA-Expression der beiden T_{H1} -polarisierenden kostimulatorischen Moleküle DLL4 und ICAM-1 (Abb.28, S.80) und den ebenfalls reduzierten mRNA-Levels der Zytokine IL-18 und IFN- β (Abb.27, S.79). Aufgrund der vollkommen Abwesenheit des allgemein als essentiell zur T_{H1} -Polarisierung geltenden Zytokins IL-12p70 nach Stimulation huDCs mit dem Gemisch der fünf allergieprotektiven Bakterien in mit einer Gesamtkonzentration von 1 oder 5×10^7 KBE/ml mag diese, wenn auch nur schwach ausgeprägte, Entwicklung von T_{H1} -Zellen zunächst paradox erscheinen. Doch finden sich in der Literatur eine Reihe von Quellen, die eine IL-12p70-unabhängige Polarisierung von T_{H1} -Zellen beschreiben²⁰⁶. Freudenberg *et al.* beispielsweise zeigten eine IL-12p70-unabhängige IFN- γ -Induktion durch Gram-negative Spezies via Aktivierung von STAT 4 durch Typ 1 IFN (IFN- α / β) und IL-18²⁰⁷. Da im vorliegenden System sowohl die mRNA von IFN- β als auch von IL-18 in geringen (IFN- β ,) oder deutlichen (IL-18) Mengen nach simultaner Stimulation huDCs nachgewiesen werden konnte, wäre dieser Mechanismus eine mögliche Erklärung für die Entstehung von T_{H1} -Zellen trotz fehlender IL-12p70-Sekretion. Auch die Beteiligung des ebenfalls zur IL-12-Familie zählenden IL-27 wäre denkbar, da auch von diesem bekannt ist, dass es an der frühen T_{H1} -Differenzierung beteiligt ist²⁰⁸. Die Sekretion dieses Zytokins wurde zwar in der vorliegenden Arbeit nicht bestimmt, da aber Karina Stein bereits zeigen konnte, dass eine Behandlung huDCs mit *L. lactis* oder *S. sciuri* zur mRNA-Induktion der beiden Untereinheiten dieses Proteins führt und sich diese beiden Spezies im hier verwendeten Bakteriengemisch befinden, scheint diese Annahme nicht ganz abwegig. Ob es durch Stimulation von huDCs mit der 5er-Kombination tatsächlich zu einer Freisetzung von IL-27 kommt, oder ob auch die Sekretion dieses Zytokins wie bei den anderen zwei zur IL-12-Familie gehörigen Zytokinen IL-12p70 und IL-23 (Daten nicht gezeigt) durch hohe bakterielle Konzentrationen inhibiert wird, ließe sich aber nur durch weitere Versuche klären.

Auch bei der IL-12p70-unabhängigen Induktion von IFN- γ -produzierenden T_{H1} -Zellen findet die Amplifikation der T_{H1} -immunantwort unter Beteiligung von IL-12p70 statt²⁰⁹, womit sich

die nur geringe Ausbildung dieses Subtyps nach simultaner Stimulation im vorliegenden System erklären ließe.

Die erhobenen Daten bezüglich einer T_{H2} -Polarisierung zeigen ebenfalls eine eindeutige Reduktion aller analysierten Parameter nach simultaner vs. Einzelstimulation. Mit Bezug auf die jeweiligen unstimulierten Kontrollen ließ sich weder für die mRNA des T_{H2} -spezifischen Transkriptionsfaktors GATA3, noch für die mRNA der T_{H2} -Zytokine IL-5 und IL-13 (Abb.32, S.86) oder das Protein IL-4 (Abb.33, S.89) eine eindeutige Hochregulation nach simultaner Stimulation feststellen, unter Einbezug der Datenstreuung zeigte sich unter Einfluss des Bakteriengemisches sogar die jeweils geringste Expression der mRNA von IL-5 und IL-13. Dies ist konform mit dem Befund, dass auch die mRNA der zwei Moleküle OX40-L und Jagged-1, die eine T_{H2} -Polarisierung fördern, nach simultaner Stimulation deutlich geringer induziert wurde, als es nach bestimmten Einzelstimulationen der Fall war (Abb.31, S.84). Die gänzliche Abwesenheit (IL-12p70, IL-1 β , IL-18), beziehungsweise das stark reduzierte Vorhandensein (IL-6, TNF- β , IFN- β) zentraler, proinflammatorischer oder DC-aktivierender Zytokine könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Behandlung von huDCs mit dem Gemisch der fünf allergieprotektiven Bakterien in hoher Konzentration (1 oder 5×10^7 KBE/ml) die vollständige Reifung der Zellen, wie sie nach den Einzelstimulationen zu verzeichnen war, unterdrückt. Ob diese Unterdrückung auf der gegenseitigen Inhibierung der verschiedenen Bakterien hinsichtlich ihrer Reifungsinduktion oder auf einer autokrinen Wirkung des vermehrt freigesetzten IL-10 beruht²⁰⁴, lässt sich anhand der vorliegen Daten nicht unterscheiden, wobei die Tatsache, dass Gorelik *et al.* in Mausmodellen des akuten allergischen Asthmas zeigen konnten, dass ein autokriner, IL-10-abhängiger Mechanismus an der durch Inhalation von Kuhstallstaubextrakt reduzierten Funktion von DCs beteiligt ist²¹⁰, eher für letztere Annahme spricht. Ein solcher „semi-reifer“ Zustand von DCs zeichnet sich nicht nur durch eine fehlende oder geringe Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus, sondern auch durch die Hochregulation der Expression kostimulatorischer Moleküle, wie CD80 und CD86 (Abb.26, S.77) gegenüber unreifen DCs aus²¹¹. Darüber hinaus ist insbesondere die hohe Sekretion von IL-10 charakteristisch²¹², die nicht nur mit der Generierung IL-10-produzierender T_{reg} -Zellen assoziiert ist²¹³, sondern dabei den entscheidenden Faktor darstellt²¹². All diese Charakteristika treffen auch auf die DCs zu, die unter Einfluss von 1 oder 5×10^7 KBE/ml des verwendeten Bakteriengemisches entstanden sind. Allerdings wäre dann auch die Entstehung großer Mengen T_{reg} -Zellen zu erwarte. Doch obwohl unter Einfluss

hoher Konzentrationen des Bakteriengemisches im Vergleich die höchsten IL-10-Level detektiert wurden (Abb.25, S.75), ist die mRNA-Expression des T_{reg} -assoziierten Transkriptionsfaktors FoxP3 in den entsprechenden DC-TC-Kokulturen im Vergleich zu den Einzelstimulationen verhältnismäßig schwach hochreguliert (Abb.35, S.90) und auch das zentrale, immunsupprimierende IL-10 wird in diesen Kokulturen vergleichsweise nur gering sezerniert (Abb.36, S.91). Doch wie bereits erläutert müssen T_{reg} -Zellen nicht zwangsläufig FoxP3⁺ sein, denn die Expression des Transkriptionsfaktors korreliert nicht mit der Suppressoraktivität dieser Zellen¹⁹ und nahezu alle Subgruppen dieser immunregulatorischen T-Zellen können IL-10 unabhängig von FoxP3 sezernieren. Zudem weist eine Vielzahl von Quellen darauf hin, dass tolerogene DCs vornehmlich T_{reg} -Zellen vom Subtyp T_{r1} induzieren^{214,19,212,215}. Wie bereits zuvor beschrieben, ist diese spezielle Untergruppe der T_{reg} -Zellen CD4⁺FoxP3⁻ und zeichnet sich durch die Sekretion großer IL-10-Mengen bei gleichzeitiger geringer oder fehlender TGF- β -Freisetzung aus¹⁹⁶.

Zusammenfassend spricht eine Vielzahl der in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten dafür, dass die Stimulation von huDCs mit einem Gemisch der fünf allergieprotektive Kuhstallisolate *L. lactis*, *A. Iwoffii*, *S. sciuri*, *Lb. curvatus* und *J. psychrophilus* in hohen Konzentrationen über einen noch nicht identifizierten Mechanismus zur Entstehung semi-reifer DCs führt. Da solche DCs die Entstehung von IL-10 sezernierenden T_{reg} -Zellen induzieren und so gleichzeitig die Proliferation von T_{H1} -und T_{H2} -Zellen vermindern, gelten sie als Vermittler der peripheren Toleranz und werden oft auch als tolerogene DCs bezeichnet²¹⁶. Da für tolerogene DCs gezeigt werden konnte, dass diese im Mausmodell des OVA-induzierten Asthmas die allergische Sensibilisierung verhindern und sogar einen bereits entwickelten, asthmatischen Phänotyp umkehren können²⁰⁶, wäre die Entstehung dieser semi-reifen Zellen eine mögliche Erklärung für den erhöhten, Mikroben-vermittelten Allergieschutz durch eine höhere Anzahl verschiedener Spezies, zu denen ein Individuum Kontakt hatte. Denn entscheidend für die Induktion der peripheren Toleranz ist hierbei das von den DCs freigesetzte IL-10, welches unter Einfluss des Bakteriengemisches in deutlich höheren Mengen freigesetzt wurde, als es nach den entsprechenden Einzelstimulationen der Fall war. Aufgrund der fehlenden starken Ausprägung von T_{reg} -Zellen, die sich zwar mit Informationen aus der Literatur erklären ließe, sich aber nicht mit eigenen, erhobenen Daten belegen lässt, wäre auch denkbar, dass die simultane Stimulation huDCs nicht zu einer gravierenden Veränderung ihrer T-Zell-polarisierenden Eigenschaft führt, sondern sich diese

auf andere Eigenschaften der DCs auswirkt. Ähnliches konnten Gorelik *et al.* durch Sensibilisierung von Mäusen mit Knochenmarks-generierten DCs, die zuvor mit einem Kuhstallstaubextrakt behandelt worden waren, zeigen²¹⁰. Sie vermuteten anhand ihrer gewonnenen Daten, dass der beobachtete, Kuhstallstaubextrakt-vermittelte allergieprotektive Effekt vielmehr auf einer verminderten Allergie-induzierenden Kapazität der behandelten DCs denn auf der Induktion eines T_H1-oder T_{reg}-polarisierende Programmes beruht. Da sich viele Parallelen zwischen den Befunden von Gorelik *et al.* und den im Zuge der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten finden lassen (Behandlung von DCs mit einem Bakteriengemisch, Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen trotz Vorhandensein großer IL-10-Mengen, verringerte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, keine eindeutige T_H1-oder T_{reg}-Entwicklung) wäre also auch dies ein möglicher allergiepräventiver Mechanismus, der durch die Behandlung huDCs mit dem gewählten Bakteriengemisch induziert werden könnte.

Auch wenn sich anhand der vorliegenden Daten nicht eindeutig klären lässt, welche Art oder welches Stadium sich durch Behandlung huDCs mit hohen Konzentrationen des Gemisches der fünf allergieprotektiven Kuhstallbakterien *L. lactis*, *A. Iwoffii*, *S. sciuri*, *Lb. curvatus* und *J. psychrophilus* entwickelt, ist insbesondere die hohe IL-10-Freisetzung bei gleichzeitiger verminderter, generell supprimierter Immunantwort ein wichtiger Befund. So ist dieser nicht nur konform mit vergleichbaren Daten (siehe oben), sondern lassen sich in der Literatur eine Vielzahl an Quellen finden, die auf die zentrale Rolle von IL-10 bei der Regulation von allergischen, T_H2-vermittelten Immunantworten hinweisen. So spielt es in diesem Kontext nicht nur aufgrund der bereits erläuterten Induktion von T_{reg}-Zellen eine zentrale Rolle¹⁸, sondern fördert auch den Antikörperwechsel vom Allergie-vermittelndem IgE zu IgG4²¹⁷. Des Weiteren konnten negative Korrelationen der IL-10-Konzentrationen in allergischen Patienten und dem Schweregrad der Erkrankung²¹⁸, sowie Allergien im Allgemeinen¹⁶¹ nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten verminderte IL-10-Konzentrationen in Neugeborenen und die späterer Entwicklung von Atopie in einen direkten Zusammenhang gebracht werden²¹⁹. Interessanterweise wird auch das in Kuhmilch enthaltene IL-10, welches trotz leicht abweichender Struktur vom humanen IL-10 mit den Rezeptoren des Menschen agieren kann, mit einem Allergieschutz in Verbindung gebracht²²⁰.

4.3.3 Hypothese zur verstärkten Allergieprotektion durch eine höhere mikrobielle Diversität

Die im Zuge der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse zeigen, dass nicht - wie anfangs hypothetisiert - synergistische Effekte für die erhöhte Allergieprotektion durch den Kontakt mit einer höheren mikrobiellen Diversität verantwortlich sein können. Vielmehr machen die Befunde deutlich, dass die Behandlung huDCs mit einer größeren Anzahl verschiedener Kuhstallbakterien im Vergleich zu den entsprechenden Einzelstimulationen zu einer allgemeinen Repression der Funktion der Zellen und der Induktion eines vollkommen anderen Aktivierungsprofils führt. Wie soeben erläutert, lassen sich anhand der vorliegenden Daten und Hinweisen aus der Literatur zwei Hypothesen bezüglich der durch eine Vielzahl von (allergieprotektiven) Bakterien induzierten Allergieprävention aufstellen, von denen eine nachstehend schematisch illustriert wurde (Abb.37). Die zugrundeliegenden Mechanismen unterscheiden sich dabei deutlich von jenen, auf denen die durch ein allergieprotektives Bakterium alleine vermittelten Wirkungen basieren, weshalb in nachstehender Abbildung eine Gegenüberstellung der (angenommenen) Wirkungsweisen vorgenommen wurde.

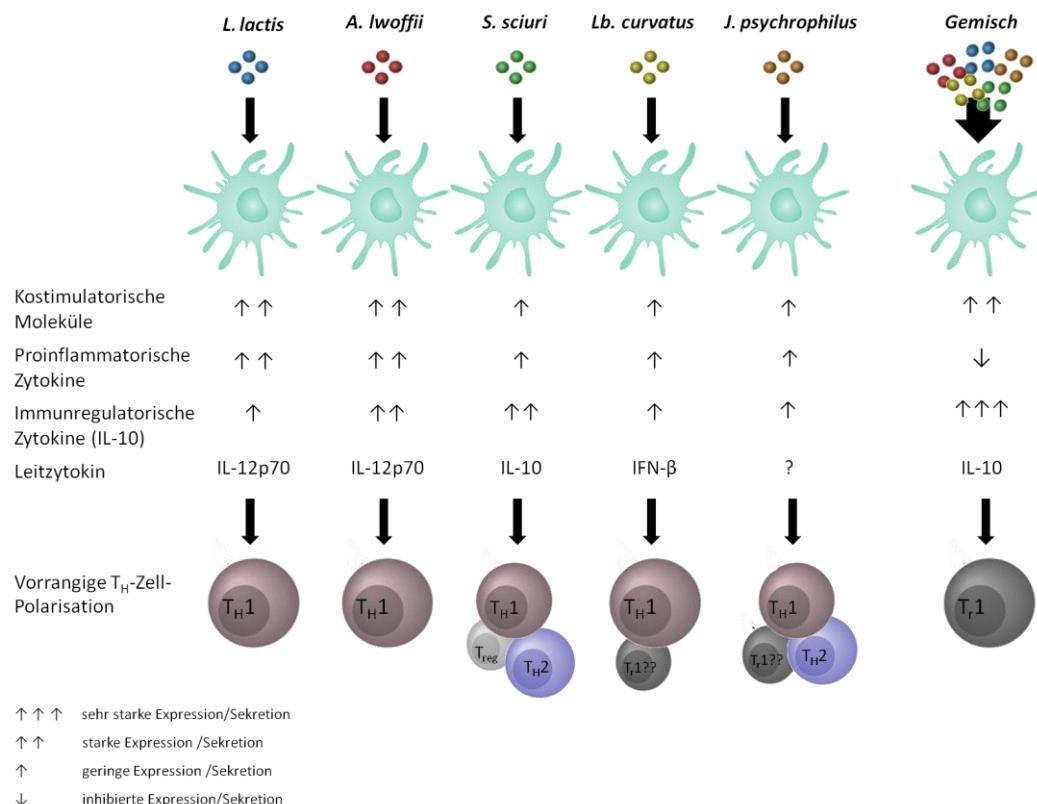


Abb.37: Schematische Gegenüberstellung der Wirkmechanismen der allergiepräventiven Effekte, die auf der alleinigen oder simultanen Wirkung der Kuhstallisolale L. lactis, A. Iwoffii, S. sciuri, Lb. curvatus und/oder J. psychrophilus auf huDCs und deren T-Zell-Polarisierungskapazität beruhen.

4.4 Fazit

Bei zusammenfassender Betrachtung machen die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse deutlich, dass die gleichzeitige Aktivierung einer Bandbreite von verschiedenen Rezeptoren durch gleichzeitigen Kontakt mit einer Vielzahl verschiedener Mikroben zu einer vielfältigen Aktivierung des Immunsystems und damit einem veränderten Induktionsprofil führt. Die hohe IL-10-Freisetzung, die sich durch Kontakt mit mehreren allergieprotektiven Bakterien gleichzeitig ergibt, ist ein zentraler Befund und kann eine mögliche experimentelle Basis für den von Ege *et al.* beobachteten Diversitätseffekt, der lediglich auf epidemiologischen Befunden beruht, bieten. Besonders aufgrund der fehlenden oder stark verminderten Induktion proinflammatorischer Zytokine nach Behandlung mit dem Bakteriengemisch aus *Lactococcus lactis* G121, *Acinetobacter Iwoffii* F78, *Staphylococcus sciuri* W620, *Jeotgalicoccus psychrophilus* W713 und *Lactobacillus curvatus* könnte sich durch Ausbleiben einer Entzündungsreaktion insbesondere in *in vivo* Modellen ein großer Vorteil gegenüber der Verwendung einzelner allergieprotektiver Stämme ergeben. Somit bieten die in dieser Arbeit erhobenen Daten nicht nur viele Ansatzpunkte für weiterführende Versuche, sondern zudem eine Grundlage für die Entwicklung allergiepräventiver Maßnahmen und Therapieansätze.

Referenzen

1. Polley, V. H., Hennig, P. & Schwitzgebel, F. *Allergieforschung in Deutschland- Ein Atlas mit Bestandsaufnahme, Defizit- und Bedarfsanalyse.* (2009).
2. Langen, U., Schmitz, R. & Steppuhn, H. Häufigkeit allergischer Erkrankungen in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz* **56**, 698–706 (2013).
3. Teil, T. Chronisch - atopische Erkrankungen Verlauf und Epidemiologie atopischer Erkrankungen im Kindesalter. 57–94 (1999).
4. Kay, A. B. Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* **344**, 30–7 (2001).
5. Taylor, A., Verhagen, J., Akdis, C. a & Akdis, M. T regulatory cells in allergy and health: a question of allergen specificity and balance. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **135**, 73–82 (2004).
6. Hansen, G. Das Th1 / Th2-Paradigma beim allergischen Asthma bronchiale. 112–119 (2001). doi:10.1007/s001120050735
7. Williams, M. A. & Bevan, M. J. Effector and Memory CTL Differentiation. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 171–192 (2007).
8. Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. a & Coffman, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* **136**, 2348–2357 (1986).
9. Mosmann, T. R. . & Coffman, R. L. . TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* **7**, 145–173 (1989).
10. Mosmann, T. R. & Sad, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today* **17**, 138–146 (1996).
11. Maggi, E. *et al.* Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J. Immunol.* **148**, 2142–2147 (1992).
12. Zhu, J. & Paul, W. E. CD4 T cells : fates , functions , and faults. *Blood* **112**, 1557–1570 (2015).
13. Murphy, K. M. & Reiner, S. L. The lineage decisions of helper T cells. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 933–44 (2002).
14. Kidd, P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern. Med. Rev.* **8**, 223–46 (2003).
15. Caza, T. & Landas, S. Functional and phenotypic plasticity of CD4 + T cell subsets. *2015*, 1–28 (2015).
16. Ivanova, E. A. & Orekhov, A. N. T Helper Lymphocyte Subsets and Plasticity in Autoimmunity and Cancer : An Overview. *2015*, (2015).
17. O'Garra, A. & Vieira, P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat. Med.* **10**, 801–5 (2004).
18. Maloy, K. J. & Powrie, F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat. Immunol.* **2**, 816–22 (2001).
19. Hubert, P., Jacobs, N., Caberg, J.-H., Boniver, J. & Delvenne, P. The cross-talk between dendritic and regulatory T cells: good or evil? *J. Leukoc. Biol.* **82**, 781–794 (2007).
20. Deniz, G. *et al.* Regulatory NK cells suppress antigen-specific T cell responses. *J. Immunol.* **180**, 850–7 (2008).
21. Steinman, R. M., Hawiger, D. & Nussenzweig, M. C. TOLEROGENICDENDRITIC CELLS. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 685–711 (2003).
22. Palomares, O. *et al.* Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *Eur. J. Immunol.* **40**, 1232–1240 (2010).

Referenzen

23. Weiner, H. L. The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and T(R)1 and T(H)3 regulatory cells. *Nat. Immunol.* **2**, 671–672 (2001).
24. Schmidt-Weber, C. B., Akdis, M. & Akdis, C. a. TH17 cells in the big picture of immunology. *J. Allergy Clin. Immunol.* **120**, 247–254 (2007).
25. Harris, T. J. *et al.* Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *J. Immunol.* **179**, 4313–4317 (2007).
26. Wilson, C. B., Rowell, E. & Sekimata, M. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 91–105 (2009).
27. Oboki, K., Ohno, T., Saito, H. & Nakae, S. Th17 and allergy. *Allergol. Int.* **57**, 121–134 (2008).
28. Molet, S. *et al.* IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* **108**, 430–438 (2001).
29. BARCZYK, A., PIERZCHALA, W. & SOZAŃSKA, E. Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. *Respir. Med.* **97**, 726–733 (2003).
30. Pennino, D. *et al.* IL-22 suppresses IFN- γ -mediated lung inflammation in asthmatic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* **131**, 562–70 (2013).
31. Nakagome, K. *et al.* High Expression of IL-22 Suppresses Antigen-Induced Immune Responses and Eosinophilic Airway Inflammation via an IL-10–Associated Mechanism. *J. Immunol.* **187**, 5077–5089 (2011).
32. Veldhoen, M. *et al.* Transforming growth factor- β ‘reprograms’ the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9–producing subset. *Nat. Immunol.* **9**, 1341–1346 (2008).
33. Zeevaart, J. G. *et al.* NIH Public Access. **130**, 9492–9499 (2009).
34. Munitz, A. & Foster, P. S. TH9 cells: In front and beyond TH2. *J. Allergy Clin. Immunol.* **129**, 1011–1013 (2012).
35. McMillan, S. J., Bishop, B., Townsend, M. J., McKenzie, A. N. & Lloyd, C. M. The absence of interleukin 9 does not affect the development of allergen-induced pulmonary inflammation nor airway hyperreactivity. *J. Exp. Med.* **195**, 51–57 (2002).
36. Soussi-Gounni, a, Kontolemos, M. & Hamid, Q. Role of IL-9 in the pathophysiology of allergic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* **107**, 575–82 (2001).
37. Jones, C. P., Gregory, L. G., Causton, B., Campbell, G. A. & Lloyd, C. M. UKPMC Funders Group Author Manuscript Activin A and TGF- β promote T H 9 cell – mediated pulmonary allergic pathology. **129**, 6–8 (2012).
38. Kemeny, D. M. The role of the T follicular helper cells in allergic disease. *Cell. Mol. Immunol.* **9**, 386–9 (2012).
39. Baumjohann, D. *et al.* Persistent Antigen and Germinal Center B Cells Sustain T Follicular Helper Cell Responses and Phenotype. *Immunity* **38**, 596–605 (2013).
40. Butch, a W., Chung, G. H., Hoffmann, J. W. & Nahm, M. H. Cytokine expression by germinal center cells. *J. Immunol.* **150**, 39–47 (1993).
41. Hale, J. S. & Ahmed, R. Memory T Follicular Helper CD4 T Cells. *Front. Immunol.* **6**, 1–9 (2015).
42. Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245–52 (1998).
43. Wieder, E. Dendritic Cells : A Basic Review. (2003).
44. Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C. & Amigorena, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 621–67 (2002).

Referenzen

45. Banchereau, J. *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 767–811 (2000).
46. Vermaelen, K. & Pauwels, R. Pulmonary dendritic cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **172**, 530–51 (2005).
47. Steinmann, R. M. IDENTIFICATION OF A NOVEL CELL TYPE IN PERIPHERAL LYMPHOID. **137**, 1142–1162 (1973).
48. WESLEY C. VAN VOORHIS, LAURA S. HAIR, R. M. S. HUMAN DENDRITIC CELLS. *J. Chem. Inf. Model.* **53**, 160 (1989).
49. Pavli, P., Maxwell, L., Van de Pol, E. & Doe, F. Distribution of human colonic dendritic cells and macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* **104**, 124–132 (1996).
50. Kadowaki, N. *et al.* Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* **194**, 863–869 (2001).
51. Price, J. D. & Tarbell, K. V. The Role of Dendritic Cell Subsets and Innate Immunity in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes and Other Autoimmune Diseases. *Front. Immunol.* **6**, 1–12 (2015).
52. Shortman, K. & Liu, Y.-J. Mouse and Human Dendritic Cell Subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 151–161 (2002).
53. Piccioli, D. *et al.* Functional specialization of human circulating CD16 and CD1c myeloid dendritic-cell subsets. *Blood* **109**, 5371–5379 (2007).
54. Shortman, K. Parentage and heritage of dendritic cells. *Blood* **97**, 3325a–3326 (2001).
55. Cheong, C. *et al.* Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209+ dendritic cells for immune T cell areas. **143**, 416–429 (2011).
56. Sallusto, B. F. & Lanzavecchia, A. Efficient Presentation of Soluble Antigen by Cultured Human Dendritic Cells Is Maintained by Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor Plus Interleukin 4 and Downregulated by Tumor Necrosis Factor. *J. Exp. Med.* **179**, (1994).
57. Huang, F. P. *et al.* A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J. Exp. Med.* **191**, 435–444 (2000).
58. Steinman, R. M., Turley, S., Mellman, I. & Inaba, K. The Induction of Tolerance by Dendritic Cells That Have Captured Apoptotic Cells. *J. Exp. Med.* **191**, 411–416 (2000).
59. Finkelman, F. D., Lees, A., Birnbaum, R., Gause, W. C. & Morris, S. C. Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion. *J. Immunol.* **157**, 1406–14 (1996).
60. Inaba, B. K., Inaba, M., Naito, M. & Steinman, R. M. Dendritic Cell Progenitors Phagocytose Particulates, Including *Bacillus Calmette-Guerin* Organisms, and Sensitize Mice to Mycobacterial Antigens In Vivo. *New York* **178**, (1993).
61. Jordens, R., Thompson, A., Ammons, R. & Koning, F. Human dendritic cells shed a functional, soluble form of the mannose receptor. *Int. Immunol.* **11**, 1775–80 (1999).
62. Mellman, I., Steinman, R. M. & Haven, N. Dendritic Cells: Specialized and Regulated Antigen Minireview. **106**, 255–258 (2001).
63. Peiser, L., Mukhopadhyay, S. & Gordon, S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 123–128 (2002).
64. Armant, M. A & Fenton, M. J. Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. *Genome Biol.* **3**, REVIEWS3011 (2002).
65. Takeda, K., Kaisho, T. & Akira, S. TOLL-LIKE RECEPTORS. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 335–376 (2003).

Referenzen

66. Travassos, L. H. *et al.* Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep.* **5**, 1000–6 (2004).
67. Mogensen, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 240–73, Table of Contents (2009).
68. Blasius, A. L. & Beutler, B. Intracellular Toll-like Receptors. *Immunity* **32**, 305–315 (2010).
69. Asselin-Paturel, C. *et al.* Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *J Exp Med* **201**, 1157–1167 (2005).
70. Jarrossay, D., Napolitani, G., Colonna, M., Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **31**, 3388–3393 (2001).
71. Franchi, L., McDonald, C., Kanneganti, T.-D., Amer, A. & Nunez, G. Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Like Receptors: Intracellular Pattern Recognition Molecules for Pathogen Detection and Host Defense. *J. Immunol.* **177**, 3507–3513 (2006).
72. Inohara, N. *et al.* Host Recognition of Bacterial Muramyl Dipeptide Mediated through NOD2. *J. Biol. Chem.* **278**, 5509–5512 (2003).
73. Girardin, S. E. Nod2 Is a General Sensor of Peptidoglycan through Muramyl Dipeptide (MDP) Detection. *J. Biol. Chem.* **278**, 8869–8872 (2003).
74. Girardin, S. E. *et al.* Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* **300**, 1584–1587 (2003).
75. Lawrence, T. The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. 1–10 (2009).
76. Honda, K. & Taniguchi, T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 644–658 (2006).
77. Davis, B.K., Wen, H., Ting, J. The Inflammasome NLRs in Immunity, Inflammation, and Associated Diseases. *Annu Rev Immunol* 707–735 (2011). doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101405.The
78. Kapsenberg, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 984–93 (2003).
79. Savina, A. & Amigorena, S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol. Rev.* **219**, 143–56 (2007).
80. Manuscript, A. Mechanisms of Costimulation. **229**, 5–11 (2010).
81. Schwartz, R. H. TCELL ANERGY. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 305–334 (2003).
82. June, C. H., Ledbetter, J. A., Unsley, P. S. & Thompson, C. B. Role of the CD28 receptor in T-cell activation. **1**, 211–216 (1990).
83. Tong, A. W. & Stone, M. J. Prospects for CD40-directed experimental therapy of human cancer. *Cancer Gene Ther.* **10**, 1–13 (2003).
84. Aste-Amezaga, M., Ma, X., Sartori, A. & Trinchieri, G. Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *J. Immunol.* **160**, 5936–44 (1998).
85. Schnare, M. *et al.* Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **2**, 947–50 (2001).
86. Kaliński, P., Hilkens, C. M. , Wierenga, E. A. & Kapsenberg, M. L. T-cell priming by type-1and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol. Today* **20**, 561–567 (1999).
87. Amsen, D. *et al.* Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* **117**, 515–526 (2004).
88. Smits, H. H. *et al.* Intercellular Adhesion Molecule-1/LFA-1 Ligation Favors Human Th1 Development. *J. Immunol.* **168**, 1710–1716 (2002).
89. De Smedt, T. *et al.* Ox40 costimulation enhances the development of T cell responses

Referenzen

- induced by dendritic cells in vivo. *J. Immunol.* **168**, 661–70 (2002).
90. Jenkins, S. J., Perona-wright, G., Worsley, A. G. F., Ishii, N. & Macdonald, A. S. Priming and Memory Induction In Vivo 1. *J. Immunol.* **179**, 3515–23 (2007).
91. Teng, M. W. L. *et al.* IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nat. Med.* **21**, 719–729 (2015).
92. Tominaga, K. *et al.* IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells. *Int. Immunol.* **12**, 151–160 (2000).
93. Fonseca-Kelly, Z. Diverse and Opposing Roles of IL-27 in Immunity. *Open Autoimmun. J.* **2**, 187–192 (2010).
94. Langrish, C. L. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* **201**, 233–240 (2005).
95. Dzupljoft, E., Dfmm, B. O. E., Bujpo, Q. & Jogmbnnbujo, J. O. B. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. **117**, (2007).
96. Huang, W., Na, L., Fidel, P. L. & Schwarzenberger, P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice. *J. Infect. Dis.* **190**, 624–31 (2004).
97. Marabelle, A. *et al.* Depleting tumor-specific Tregs at a single site eradicates disseminated tumors. *J. Clin. Invest.* **123**, 2447–2463 (2013).
98. Mangan, P. R. *et al.* Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage. *Nature* **441**, 231–234 (2006).
99. Chen, W. Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *J. Exp. Med.* **198**, 1875–1886 (2003).
100. Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N. K., Valdez, P. a & Hymowitz, S. G. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 71–109 (2011).
101. Ng, T. H. S. *et al.* Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Front. Immunol.* **4**, 129 (2013).
102. de Jong, E. C., Smits, H. H. & Kapsenberg, M. L. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin. Immunopathol.* **26**, 289–307 (2005).
103. Dardalhon, V., Awasthi, A., H, K., G, G. & Gao, W. IL-4 inhibits TGF- β -induced Foxp3+ T cells and, together with TGF- β , generates IL-9+IL-10+Foxp3- effector T cells. *Nat Immunol* **9**, 1347–1355 (2008).
104. Edwards, A. D. *et al.* Microbial recognition via Toll-like receptor-dependent and -independent pathways determines the cytokine response of murine dendritic cell subsets to CD40 triggering. *J. Immunol.* **169**, 3652–3660 (2002).
105. Rissoan, M., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G. & Briere, F. Reciprocal Control of T Helper Cell and Dendritic Cell Differentiation. **28**, (1994).
106. de Jong, E. C. *et al.* Microbial Compounds Selectively Induce Th1 Cell-Promoting or Th2 Cell-Promoting Dendritic Cells In Vitro with Diverse Th Cell-Polarizing Signals. *J. Immunol.* **168**, 1704–1709 (2002).
107. Keratinocytes, D. R. H. *et al.* Double-Stranded RNA-Exposed Human Keratinocytes Promote Th1 Responses by Inducing a Type-1 Polarized Phenotype in Dendritic Cells: Role of Keratinocyte-Derived Tumor Necrosis Factor α , Type I Interferons, and Interleukin-18. **990–997** (2003).
108. Caron, G. *et al.* Histamine polarizes human dendritic cells into Th2 cell-promoting effector dendritic cells. *J. Immunol.* **167**, 3682–3686 (2001).
109. Tanaka, H., Demeure, C. E., Rubio, M., Delespesse, G. & Sarfati, M. Human monocyte-

Referenzen

- derived dendritic cells induce naive T cell differentiation into T helper cell type 2 (Th2) or Th1/Th2 effectors. Role of stimulator/responder ratio. *J. Exp. Med.* **192**, 405–12 (2000).
110. Shortman, K. & Heath, W. R. Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells. *Nat. Immunol.* **2**, 988–9 (2001).
111. de Heer, H. J. Essential Role of Lung Plasmacytoid Dendritic Cells in Preventing Asthmatic Reactions to Harmless Inhaled Antigen. *J. Exp. Med.* **200**, 89–98 (2004).
112. Lambrecht, B. N. & Hammad, H. Taking our breath away: dendritic cells in the pathogenesis of asthma. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 994–1003 (2003).
113. Holt, P. G., Macaubas, C., Stumbles, P. a & Sly, P. D. The role of allergy in the development of asthma. *Nature* **402**, B12–B17 (1999).
114. Larché, M., Robinson, D. S. & Kay, A. B. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **111**, 450–463 (2003).
115. Hammad, H. *et al.* Th2 polarization by Der p 1--pulsed monocyte-derived dendritic cells is due to the allergic status of the donors. *Blood* **98**, 1135–41 (2001).
116. Hammad, H. & Lambrecht, B. N. Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **118**, 331–6 (2006).
117. Lambrecht, B. N., Salomon, B., Klatzmann, D. & Pauwels, R. A. Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice. *J. Immunol.* **160**, 4090–7 (1998).
118. Stumbles, P. A. *et al.* Resting Respiratory Tract Dendritic Cells Preferentially Stimulate T Helper Cell Type 2 (Th2) Responses and Require Obligatory Cytokine Signals for Induction of Th1 Immunity. *J. Exp. Med.* **188**, 2019–2031 (1998).
119. Van Rijt, L. S. *et al.* Allergen-induced accumulation of airway dendritic cells is supported by an increase in CD31hiLy-6Cneg bone marrow precursors in a mouse model of asthma. *Blood* **100**, 3663–3671 (2002).
120. Lambrecht, B. N. *et al.* Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *J. Clin. Invest.* **106**, 551–9 (2000).
121. van Rijt, L. S. *et al.* In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J. Exp. Med.* **201**, 981–991 (2005).
122. Tsitoura, D. C., DeKruyff, R. H., Lamb, J. R. & Umetsu, D. T. Intranasal exposure to protein antigen induces immunological tolerance mediated by functionally disabled CD4+ T cells. *J. Immunol.* **163**, 2592–2600 (1999).
123. Lambrecht, B. N. & Hammad, H. The role of dendritic and epithelial cells as master regulators of allergic airway inflammation. *Lancet* **376**, 835–43 (2010).
124. Skadhauge, L. R., Christensen, K., Kyvik, K. O. & Sigsgaard, T. Genetic and environmental influence on asthma: A population-based study of 11,688 Danish twin pairs. *Eur. Respir. J.* **13**, 8–14 (1999).
125. Vercelli, D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 169–182 (2008).
126. Crevel, R. W. R. & Pickup, J. Too clean , or not too clean : the Hygiene Hypothesis and home hygiene Clinical and Experimental Allergy. 402–425 (2006).
127. Weiland, S. K. *et al.* Prevalence of respiratory and atopic disorders among children in the East and West of Germany five years after unification. *Eur. Respir. J.* **14**, 862–70 (1999).
128. Marks, G. B. Environmental factors and gene-environment interactions in the

- aetiology of asthma. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **33**, 285–9 (2006).
129. Strachan, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. **299**, 1259–1260 (1989).
130. von Mutius, E. Allergies, infections and the hygiene hypothesis - The epidemiological evidence. *Immunobiology* **212**, 433–439 (2007).
131. Bach, J.-F. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N. Engl. J. Med.* **347**, 911–20 (2002).
132. Nowak, D. *et al.* Prevalence of respiratory symptoms, bronchial hyperresponsiveness and atopy among adults: West and East Germany. *Eur. Respir. J.* **9**, 2541–2552 (1996).
133. Riedler, J. *et al.* Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* **358**, 1129–33 (2001).
134. Filipiak, B., Heinrich, J., Schafer, T., Ring, J. & Wichmann, H. E. Farming, rural lifestyle and atopy in adults from southern Germany--results from the MONICA/KORA study Augsburg. *Clin Exp Allergy* **31**, 1829–1838 (2001).
135. Leynaert, B. *et al.* Does living on a farm during childhood protect against asthma, allergic rhinitis, and atopy in adulthood? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164**, 1829–1834 (2001).
136. Klintberg, B., Berglund, N., Lilja, G., Wickman, M. & van Hage-Hamsten, M. Fewer allergic respiratory disorders among farmers' children in a closed birth cohort from Sweden. *Eur. Respir. J.* **17**, 1151–1157 (2001).
137. Chrischilles, E. *et al.* Asthma prevalence and morbidity among rural Iowa schoolchildren. *J. Allergy Clin. Immunol.* **113**, 66–71 (2004).
138. Ernst, P. & Cormier, Y. Relative scarcity of asthma and atopy among rural adolescents raised on a farm. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**, 1563–1566 (2000).
139. Riedler, J., Eder, W., Oberfeld, G. & Schreuer, M. Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization. *Clin. Exp. Allergy* **30**, 194–200 (2000).
140. Downs, S. H. *et al.* Having lived on a farm and protection against allergic diseases in Australia. *Clin. Exp. Allergy* **31**, 570–5 (2001).
141. Peters, M. *et al.* Inhalation of stable dust extract prevents allergen induced airway inflammation and hyperresponsiveness. *Thorax* **61**, 134–139 (2006).
142. Braun-Fahrländer, C. *et al.* Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N. Engl. J. Med.* **347**, 869–77 (2002).
143. Gerhold, K., Bluemchen, K., Franke, A., Stock, P. & Hamelmann, E. Exposure to endotoxin and allergen in early life and its effect on allergen sensitization in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* **112**, 389–96 (2003).
144. Van Strien, R. T. *et al.* Microbial exposure of rural school children, as assessed by levels of N-acetyl-muramic acid in mattress dust, and its association with respiratory health. *J. Allergy Clin. Immunol.* **113**, 860–867 (2004).
145. Ege, M. J. *et al.* Not all farming environments protect against the development of asthma and wheeze in children. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**, 1140–1147 (2007).
146. Banerjee, B. *et al.* Modulation of Airway Inflammation by Immunostimulatory CpG Oligodeoxynucleotides in a Murine Model of Allergic Aspergillosis Modulation of Airway Inflammation by Immunostimulatory CpG Oligodeoxynucleotides in a Murine Model of Allergic Aspergillosis. **72**, 6087–6094 (2004).
147. Sayers, I. *et al.* Suppression of allergic airway disease using mycobacterial lipoglycans. *J. Allergy Clin. Immunol.* **114**, 302–9 (2004).
148. Debarry, J. *et al.* Acinetobacter Iwoffii and Lactococcus lactis strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties. *J. Allergy Clin. Immunol.*

Referenzen

- 119, 1514–21 (2007).
149. Ege, M. J. *et al.* Environmental bacteria and childhood asthma. *Allergy* **67**, 1565–71 (2012).
150. Hagner, S. *et al.* Farm-derived Gram-positive bacterium *Staphylococcus sciuri* W620 prevents asthma phenotype in HDM- and OVA-exposed mice. *Allergy* **68**, 322–9 (2013).
151. Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch Kuhstallbakterien: Rezeptoren, Signaltransduktion und Mediatorfreisetzung. (2012).
152. Gassner, M., Grize, L. & Neu, U. Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. *Clin. Exp. Allergy* **29**, 28–34 (1999).
153. Ege, M. J. *et al.* Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children. *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**, 817–823 (2006).
154. Loss, G. *et al.* The protective effect of farm milk consumption on childhood asthma and atopy: The GABRIELA study. *J. Allergy Clin. Immunol.* **128**, 766–773.e4 (2011).
155. Ege, M. J. *et al.* Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *N. Engl. J. Med.* **364**, 701–9 (2011).
156. von Mutius, E. 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: farm lifestyles and the hygiene hypothesis. *Clin. Exp. Immunol.* **160**, 130–5 (2010).
157. Okada, H., Kuhn, C., Feillet, H. & Bach, J.-F. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin. Exp. Immunol.* **160**, 1–9 (2010).
158. Adkins, B., Leclerc, C. & Marshall-Clarke, S. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 553–64 (2004).
159. Garn, H. & Renz, H. Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis. *Immunobiology* **212**, 441–52 (2007).
160. Vandenbulcke, L., Bachert, C., Van Cauwenberge, P. & Claeys, S. The innate immune system and its role in allergic disorders. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **139**, 159–65 (2006).
161. Yazdanbakhsh, M. & Matricardi, P. Parasites and the hygiene hypothesis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **26**, 15–23 (2004).
162. Yazdanbakhsh, M. Th2 Responses without Atopy: Immunoregulation in Chronic Helminth Infections and Reduce Allergic Disease. *Trends Immunol.* **22**, 372–377 (2001).
163. Gern, J. E. & Busse, W. W. Relationship of viral infections to wheezing illnesses and asthma. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 132–138 (2002).
164. von Mutius, E. & Vercelli, D. Farm living: effects on childhood asthma and allergy. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 861–8 (2010).
165. Schaub, B. *et al.* Maternal farm exposure modulates neonatal immune mechanisms through regulatory T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **123**, 774–82.e5 (2009).
166. Romagnani, S. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology* **112**, 352–63 (2004).
167. Debarry, J., Hanuszkiewicz, a, Stein, K., Holst, O. & Heine, H. The allergy-protective properties of *Acinetobacter lwoffii* F78 are imparted by its lipopolysaccharide. *Allergy* **65**, 690–7 (2010).
168. Fischer, K. *et al.* Cytokine-inducing lipoteichoic acids of the allergy-protective

Referenzen

- bacterium *Lactococcus lactis* G121 do not activate via Toll-like receptor 2. *Glycobiology* **21**, 1588–95 (2011).
169. Böyum, A. Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyteaggregating agents. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* **97**, 31–50 (1968).
170. Ege, M. J. *et al.* Environmental bacteria and childhood asthma. *Allergy* **67**, 1565–71 (2012).
171. Tada, H., Aiba, S., Shibata, K., Ohteki, T. & Takada, H. Synergistic Effect of Nod1 and Nod2 Agonists with Toll-Like Receptor Agonists on Human Dendritic Cells To Generate Interleukin-12 and T Helper Type 1 Cells Synergistic Effect of Nod1 and Nod2 Agonists with Toll-Like Receptor Agonists on Human Dendritic Ce. *Infect. Immun.* **73**, 7967–7976 (2005).
172. Kushwah, R. & Hu, J. Role of dendritic cells in the induction of regulatory T cells. *Cell Biosci.* **1**, 20 (2011).
173. Debarry, J. Mögliche Mechanismen der Allergieprävention: Dendritische Zellen als Regulatoren der durch Stallbakterien ausgelösten allergieprotektiven Immunantwort. (2007).
174. Kaiko, G. E., Horvat, J. C., Beagley, K. W. & Hansbro, P. M. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* **123**, 326–38 (2008).
175. Mullen, a C. *et al.* Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* **292**, 1907–1910 (2001).
176. Pennock, N. D. *et al.* T cell responses: naive to memory and everything in between. *AJP Adv. Physiol. Educ.* **37**, 273–283 (2013).
177. Pennock, N. D. *et al.* T cell responses: naive to memory and everything in between. *AJP Adv. Physiol. Educ.* **37**, 273–283 (2013).
178. Yoshimoto, T. *et al.* IL-12 Up-Regulates IL-18 Receptor Expression on T Cells, Th1 Cells, and B Cells: Synergism with IL-18 for IFN- γ Production 1. (1998).
179. Gu, Y. *et al.* Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. *Science* **275**, 206–209 (1997).
180. Nagai, T. *et al.* Timing of IFN- γ Exposure during Human Dendritic Cell Maturation and Naive Th Cell Stimulation Has Contrasting Effects on Th1 Subset Generation: A Role for IFN- γ -Mediated Regulation of IL-12 Family Cytokines and IL-18 in Naive Th Cell Differentiation. *J. Immunol.* **171**, 5233–5243 (2003).
181. Yasumi, T. *et al.* Limited ability of antigen-specific Th1 responses to inhibit Th2 cell development in vivo. *J. Immunol.* **174**, 1325–31 (2005).
182. Yagi, R., Zhu, J. & Paul, W. E. An updated view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation. *Int. Immunol.* **23**, 415–420 (2011).
183. Romagnani, S. Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. *J. Allergy Clin. Immunol.* **113**, 395–400 (2004).
184. Paul, W. E., Zhu, J. & Yamane, H. How are TH2-type immune responses initiated and amplified? *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 445–489 (2010).
185. Moser, M. & Murphy, K. M. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat. Immunol.* **1**, 199–205 (2000).
186. MacDonald, A. S. & Maizels, R. M. Alarming dendritic cells for Th2 induction. *J. Exp. Med.* **205**, 13–17 (2008).
187. MacDonald, A. S. & Pearce, E. J. Cutting edge: polarized Th cell response induction by transferred antigen-pulsed dendritic cells is dependent on IL-4 or IL-12 production by

Referenzen

- recipient cells. *J. Immunol.* **168**, 3127–3130 (2002).
188. Perona-Wright, G. *et al.* Distinct sources and targets of IL-10 during dendritic cell-driven Th1 and Th2 responses in vivo. *Eur. J. Immunol.* **36**, 2367–2375 (2006).
189. Ito, T. *et al.* TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J. Exp. Med.* **202**, 1213–23 (2005).
190. Napolitani, G., Rinaldi, A., Bertoni, F., Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat. Immunol.* **6**, 769–76 (2005).
191. Jember, a G., Zuberi, R., Liu, F. T. & Croft, M. Development of allergic inflammation in a murine model of asthma is dependent on the costimulatory receptor OX40. *J. Exp. Med.* **193**, 387–392 (2001).
192. Weinberg, a D., Wegmann, K. W., Funatake, C. & Whitham, R. H. Blocking OX-40/OX-40 ligand interaction in vitro and in vivo leads to decreased T cell function and amelioration of experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.* **162**, 1818–26 (1999).
193. Trinchieri, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J. Exp. Med. Comment. JEM* **00**, 239–243 (2007).
194. Adalid-Peralta, Laura, Fragoso, Gladis, Fleury, Agnes, Sciutto, E. Mechanisms Underlying the Induction of Regulatory T cells and Its Relevance in the Adaptive Immune Response in Parasitic Infections. *Int. J. Biol. Sci.* **1**, 1412–1426 (2011).
195. Saraiva, M. & O'Garra, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 170–181 (2010).
196. Hawrylowicz, C. M. & O'Garra, a. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 271–283 (2005).
197. Groux, H. *et al.* A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**, 737–742 (1997).
198. Barrat, F. J. *et al.* In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J. Exp. Med.* **195**, 603–16 (2002).
199. Gol-Ara, M., Jadidi-Niaragh, F., Sadria, R., Azizi, G. & Mirshafiey, A. The role of different subsets of regulatory T cells in immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis* **2012**, 805875 (2012).
200. Gerosa, F. *et al.* Interleukin-12 primes human CD4 and CD8 T cell clones for high production of both interferon-gamma and interleukin-10. *J. Exp. Med.* **183**, 2559–69 (1996).
201. Rutz, S. *et al.* Notch regulates IL-10 production by T helper 1 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 3497–3502 (2008).
202. Störmer, A. Synergistische Aktivierung humaner dendritischer Zellen durch Kuhstallbakterien. (2012).
203. Angelica, M. D. & Fong, Y. Dendritic Cells post-Maturation Are Reprogrammed with Heightened IFN- γ and IL-10. *October* **141**, 520–529 (2008).
204. Corinti, S., Albanesi, C., la Sala, A., Pastore, S. & Girolomoni, G. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J. Immunol.* **166**, 4312–8 (2001).
205. Couper, K., Blount, D. & Riley, E. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J. Immunol.* **180**, 5771–5777 (2008).
206. Nayyar, A. *et al.* Induction of prolonged asthma tolerance by IL-10-differentiated dendritic cells: differential impact on airway hyperresponsiveness and the Th2 immunoinflammatory response. *J. Immunol.* **189**, 72–9 (2012).

Referenzen

207. Freudenberg, M. a *et al.* Cutting edge: a murine, IL-12-independent pathway of IFN-gamma induction by gram-negative bacteria based on STAT4 activation by Type I IFN and IL-18 signaling. *J. Immunol.* **169**, 1665–1668 (2002).
208. Yoshimoto, T. *et al.* Regulation of antitumor immune responses by the IL-12 family cytokines, IL-12, IL-23, and IL-27. *Clin. Dev. Immunol.* **2010**, (2010).
209. Kuipers, H. *et al.* Lipopolysaccharide-induced suppression of airway Th2 responses does not require IL-12 production by dendritic cells. *J. Immunol.* **171**, 3645–3654 (2003).
210. Gorelik, L. *et al.* Modulation of dendritic cell function by cowshed dust extract. *Innate Immun.* **14**, 345–55 (2008).
211. Lutz, M. B. & Schuler, G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: Which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* **23**, 445–449 (2002).
212. Kushwah, R. & Hu, J. Role of dendritic cells in the induction of regulatory T cells. *Cell Biosci.* **1**, 20 (2011).
213. Hart, A. L. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut* **53**, 1602–1609 (2004).
214. Fu, C. L., Chuang, Y. H., Huang, H. Y. & Chiang, B. L. Induction of IL-10 producing CD4+ T cells with regulatory activities by stimulation with IL-10 gene-modified bone marrow derived dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* **153**, 258–268 (2008).
215. Levings, M. K. *et al.* Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25 + CD4 + Treg cells. *Differentiation* **105**, 1–36 (2004).
216. Cools, N. *et al.* Immunosuppression induced by immature dendritic cells is mediated by TGF-beta/IL-10 double-positive CD4+ regulatory T cells. *J. Cell. Mol. Med.* **12**, 690–700 (2008).
217. Akdis, C. a. Therapies for allergic inflammation: refining strategies to induce tolerance. *Nat. Med.* **18**, 736–49 (2012).
218. Heaton, T. *et al.* Mechanisms of Disease An immunoepidemiological approach to asthma: identification of in-vitro T-cell response patterns associated with different wheezing phenotypes in children. **365**, (2005).
219. Prescott, S. L. *et al.* Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet* **353**, 196–200 (1999).
220. Fallis, A. . Allergien: Die Rohmilch macht's. *J. Chem. Inf. Model.* **53**, 1689–1699 (2013).

Zusammenfassung

Eine Reihe von epidemiologischen Studien belegt, dass das Aufwachsen auf einem traditionell geführten Bauernhof das Risiko vermindert, später im Leben allergische Erkrankungen zu entwickeln. Mittlerweile ist hinreichend belegt, dass dieser Effekt größtenteils durch vermehrt in der bäuerlichen Umgebung vorkommende Bestandteile von Pilzen, Pflanzen und insbesondere von Bakterien vermittelt wird. Die drei aus Kuhställen isolierten Bakterienstämme *Lactococcus lactis* G121, *Acinetobacter Iwoffii* F78 und *Staphylococcus sciuri* W620, die sich durch ihre besonders hohe Abundanz auszeichneten, erwiesen sich in einem *in vivo* Mausmodell der akuten allergischen Entzündung als allergieprotektiv. Verschiedene *in vitro* Daten konnten zeigen, dass diese Mikroben-vermittelte Allergieprävention auf der Fähigkeit der Isolate beruht, die T_H -Zell-polarisierenden Eigenschaften huDCs maßgeblich zu beeinflussen. So können sie durch Kontakt in den ersten Lebensjahren, die entscheidend für die Reifung des Immunsystems und der Entwicklung einer gesunden T_H -Zell-Balance sind, durch Induktion von T_H1 - oder T_{reg} -Zellen die Entwicklung der Allergie-assoziierten T_H2 -Zellen unterdrücken. Vorangegangene Arbeiten in diesem Kontext konnten zeigen, dass die Bakterien-vermittelte Allergieprotektion durch vielfältige Mechanismen erreicht werden kann. Zusammen mit den Befunden neuerer Studien, die zeigen, dass der Mikroben-induzierte Allergieschutz umso stärker ist, je höher die mikrobielle Vielfalt ist, denen Bauernhofkinder ausgesetzt sind (Diversitätseffekt), stellte sich die Frage, welche immunologischen Mechanismen für diese verstärkte Allergieprotektion verantwortlich sein können. Daraus ergab sich der Ansatz, die Effekte einer alleinigen Stimulation von huDCs mit einem Allergie-protektiven Bakterium mit denen, die durch Stimulation mit einem Bakteriengemisch bewirkt wurden, zu vergleichen, insbesondere in Hinblick auf die resultierende T_H -Zell-polarisierenden Kapazitäten von huDCs. Zu diesem Zwecke wurden zunächst zwei weitere, ebenfalls mit einem Allergieschutz in Verbindung gebrachte Kuhstallisolate, *Lactobacillus curvatus* und *Jeotgalicoccus psychrophilus* W713 hinsichtlich ihrer grundlegenden immunmodulatorischen Eigenschaften untersucht, um diese nach festgestellter Eignung zusätzlich zu den drei bereits charakterisierten, allergiepräventiven Isolaten *Lactococcus lactis* G121, *Acinetobacter Iwoffii* F78 und *Staphylococcus sciuri* W620 in das zu testende Bakteriengemisch aufnehmen zu

Zusammenfassung

können. Die anfangs aufgestellte Hypothese, dass synergistische Effekte für den Diversitätseffekt verantwortlich sein könnten, wurde bereits durch die ersten Ergebnisse dieser Arbeit widerlegt; vielmehr wurde deutlich, dass die Behandlung mit dem Bakteriengemisch in einem Reifungszustand und einer T_H -Zell-Polarisierungskapazität der huDCs resultierte, die stark von den durch Einzelstimulationen bewirkten abwichen. Während die Einzelstimulationen von huDCs durch Induktion immunogener DCs zu einer starken T_H1 - (*Lactococcus lactis* G121, *Acinetobacter Iwoffii* F78, *Lactobacillus curvatus*), oder zu keiner eindeutigen T_H -Zell-Polarisierung (*Staphylococcus sciuri* W620, *Jeotgalicoccus psychrophilus* W713) führte, induzierte das Gemisch dieser fünf Isolate eine allgemeine Suppression der Immunantwort und tolerogene DCs mit der Fähigkeit, T_{r1} -Zellen zu induzieren. Als zentraler Befund ist die stark erhöhte Freisetzung des immunregulatorischen IL-10 nach simultaner Bakterienstimulation von huDCs zu nennen, die für die Entwicklung der tolerogenen DCs und der T_{r1} -Zellen verantwortlich sein könnte. Diese war begleitet durch die gleichzeitige Abwesenheit oder stark verminderte Anwesenheit zentraler proinflammatorischen Zytokine, was sich insbesondere im Hinblick auf eine potentielle therapeutische Anwendung eines Gemisches dieser allergieprotektiven Kuhstallbakterien als vorteilhaft erweisen könnte.

Abstract

A great number of epidemiological studies show that growing up on a traditional farm protects from the development of asthma and allergic disease later in life. Meanwhile it is well documented that these effect are mainly mediated by components of fungi, plants and particularly bacteria existing increasingly in farming environment. Three bacterial species characterized by their high abundance, namely *Lactococcus lactis* G121, *Acinetobacter lwoffii* F78 and *Staphylococcus sciuri* W620, were isolated from cowsheds of farms and were shown to prevent an allergic immune responses in a mouse model of acute allergic inflammation. Several *in vitro* data revealed that this microbial-induced allergy prevention is essentially based on the ability of those cowshed-isolates to influence T_H -cell-polarizing capacities of huDCs. Through contact early in life, which is the crucial time frame for the maturation and development of a healthy T_H -cell-balance, these bacteria can inhibit the development of allergy-associated T_H2 -cells by the induction of T_H1 - or T_{reg} -cells. Previous data showed that the bacteria-induced allergy protection may be achieved by several mechanisms. Together with recent studies showing a positive association between microbial diversity and the strength of allergy protection (diversity effect) the question about the immunological mechanisms being responsible for this enhanced protection arose. To gain further insight into these mechanisms the effects induced by single-strain stimulation of huDCs should be compared to those being caused by a mix of allergy protective bacteria, with special focus on the DCs' T_H -cell-polarizing abilities. For this purpose, first the principal immunological properties of two more cowshed-isolates also being associated with allergy protection, *Lactobacillus curvatus* and *Jeotgalicoccus psychrophilus* W713, were analyzed and later added to the stimulation-mix of the three already characterized allergy preventive isolates *Lactococcus lactis* G121, *Acinetobacter lwoffii* F78 and *Staphylococcus sciuri* W620. The initial hypothesis that synergistic effects could be responsible for the diversity effect was disproved by the first results of the current thesis. Rather it became obvious that the treatment of huDCs with the bacteria-mix led to a DC status of mature- and T_H -cell-polarizing capacity which deviated significantly from those induced by single-strain stimulation. While single-strain stimulation led either to a strong T_H1 -polarisation via induction of immunogenic DCs (*Lactococcus lactis* G121, *Acinetobacter lwoffii* F78, *Lactobacillus curvatus*) or to an ambiguous T_H -cell-polarization (*Staphylococcus sciuri* W620, *Jeotgalicoccus psychrophilus*)

Abstract

W713) multi-strain stimulation led to a general suppression of the immune response via induction of tolerogenic DCs being competent to induce the development of T_r1-cells. The high secretion of the immunoregulatory cytokine IL-10 following multi-strain stimulation of huDCs is a pivotal finding and could explain the development of tolerogenic DCs and T_r1-cells. Concurrent with this the secretion of pro-inflammatory cytokines was abolished or at least diminished, a fact that could be of advantage regarding the potential therapeutic administration of a mix of allergy protective cowshed bacteria.

Abbildungsverzeichnis

Abb.1:T-Zell-Aktivierung und -Polarisierung durch DCs.....	18
Abb.2:CXCL8-Freisetzung NOD1- und NOD2-transfzierter HEK293-Zellen nach Stimulation mit <i>J. psychrophilus</i> und <i>Lb. curvatus</i>	41
Abb.3:CXCL8-Freisetzung TLR2- und TLR4-transfzierter HEK293-Zellen nach Stimulation mit <i>J. psychrophilus</i> und <i>Lb. curvatus</i>	42
Abb.4:Freisetzung von IL-6 und TNF- α aus humanen DCs nach Stimulation mit <i>J. psychrophilus</i> und <i>Lb. curvatus</i>	43
Abb.5:Expression kostimulatorischer Moleküle auf humanen DCs nach Stimulation mit <i>J. psychrophilus</i> und <i>Lb. curvatus</i>	44
Abb.6:Freisetzung von IL-12p70 aus humanen DCs nach Stimulation mit <i>J. psychrophilus</i> und <i>Lb. curvatus</i>	46
Abb.7:Expression der IFN- β -mRNA in humanen DCs nach Stimulation mit <i>J. psychrophilus</i> und <i>Lb. curvatus</i>	46
Abb.8:Expression der ICAM- und DLL4-mRNA in humanen DCs nach Stimulation mit <i>J. psychrophilus</i> und <i>Lb. curvatus</i>	47
Abb.9:Expression der T-bet- und IL-2-mRNA in Kokulturen humaner DCs mit autologen T-Zellen nach Stimulation mit <i>J. psychrophilus</i> und <i>Lb. curvatus</i>	49
Abb.10:Freisetzung von IFN- γ und TNF- α aus Kokulturen humaner DCs mit autologen T-Zellen nach Stimulation mit <i>J. psychrophilus</i> und <i>Lb. curvatus</i>	50
Abb.11:Expression der OX40-L- und Jagged-1-mRNA in humanen DCs nach Stimulation mit <i>J. psychrophilus</i> und <i>Lb. curvatus</i>	51
Abb.12:Expression der IL-5-und IL-13-mRNA in Kokulturen humaner DCs mit autologen T-Zellen nach Stimulation mit <i>J. psychrophilus</i> und <i>Lb. curvatus</i>	53
Abb.13:Expression der GATA-3-mRNA in Kokulturen humaner DCs mit autologen T-Zellen nach Stimulation mit <i>J. psychrophilus</i> und <i>Lb. curvatus</i>	54
Abb.14:Freisetzung von IL-4 aus Kokulturen humaner DCs mit autologen T-Zellen nach Stimulation mit <i>J. psychrophilus</i> und <i>Lb. curvatus</i>	55
Abb.15:Freisetzung von IL-10 und Expression der TGF- β -mRNA nach Stimulation humaner DCs mit <i>J. psychrophilus</i> und <i>Lb. curvatus</i>	56
Abb.16:Expression der FoxP3- und TGF- β -mRNA in Kokulturen humaner DCs mit autologen T-Zellen nach Stimulation mit <i>J. psychrophilus</i> und <i>Lb. curvatus</i>	57

Abbildungsverzeichnis

Abb.17:Freisetzung von IL-10 aus Kokulturen humaner DCs mit autologen T-Zellen nach Stimulation mit <i>J. psychrophilus</i> und <i>Lb. curvatus</i>	58
Abb.18:Freisetzung von IL-6 aus humanen DCs nach Einzel- oder simultaner Stimulation mit <i>L. lactis</i>, <i>A. Iwoffii</i> und <i>S. sciuri</i>	61
Abb.19:Freisetzung von TNF-α aus humanen DCs nach Einzel-oder simultaner Stimulation mit <i>L. lactis</i>, <i>A. Iwoffii</i> und <i>S. sciuri</i>	63
Abb.20:Freisetzung von IL-10 aus humanen DCs nach Einzel-oder simultaner Stimulation mit <i>L. lactis</i>, <i>A. Iwoffii</i> und <i>S. sciuri</i>	65
Abb.21:Freisetzung von IL-12 aus humanen DCs nach Einzel-oder simultaner Stimulation mit <i>L. lactis</i>, <i>A. Iwoffii</i> und <i>S. sciuri</i>	66
Abb.22:Freisetzung von IL-6 aus humanen DCs nach Einzel-oder simultaner Stimulation mit <i>L. lactis</i>, <i>A. Iwoffii</i>, <i>S. sciuri</i>, <i>Lb. curvatus</i> und <i>J. psychrophilus</i>	71
Abb.23:Freisetzung von TNF-α aus humanen DCs nach Einzel-oder simultaner Stimulation mit <i>L. lactis</i>, <i>A. Iwoffii</i>, <i>S. sciuri</i>, <i>Lb. curvatus</i> und <i>J. psychrophilus</i>.....	72
Abb.24:Freisetzung von IL-12p70 aus humanen DCs nach Einzel-oder simultaner Stimulation mit <i>L. lactis</i>, <i>A. Iwoffii</i>, <i>S. sciuri</i>, <i>Lb. curvatus</i> und <i>J. psychrophilus</i>.....	74
Abb.25:Freisetzung von IL-10 aus humanen DCs nach Einzel-oder simultaner Stimulation mit <i>L. lactis</i>, <i>A. Iwoffii</i>, <i>S. sciuri</i>, <i>Lb. curvatus</i> und <i>J. psychrophilus</i>.....	75
Abb.26:Expression kostimulatorischer Moleküle auf humanen DCs nach Einzel-oder simultaner Stimulation mit <i>L. lactis</i>, <i>A. Iwoffii</i>, <i>S. sciuri</i>, <i>J. psychrophilus</i> und <i>Lb. curvatus</i>.....	77
Abb.27:Expression der IL-18- und IFN-β-mRNA in humanen DCs nach Einzel-oder simultaner Stimulation mit <i>L. lactis</i>, <i>A. Iwoffii</i>, <i>S. sciuri</i>, <i>Lb. curvatus</i> und <i>J. psychrophilus</i>.....	79
Abb.28:Expression der ICAM-1- und DLL4-mRNA in humanen DCs nach Einzel-oder simultaner Stimulation mit <i>L. lactis</i>, <i>A. Iwoffii</i>, <i>S. sciuri</i>, <i>Lb. curvatus</i> und <i>J. psychrophilus</i>.....	80
Abb.29:Expression der T-bet- und IL-2-mRNA in Kokulturen humaner DCs mit autologen T-Zellen nach Einzel-oder simultaner Stimulation mit <i>L. lactis</i>, <i>A. Iwoffii</i>, <i>S. sciuri</i>, <i>Lb. curvatus</i> und <i>J. psychrophilus</i>	81
Abb.30:Freisetzung von TNF-α und IFN-γ aus Kokulturen humaner DCs mit autologen T-Zellen nach Einzel-oder simultaner Stimulation mit <i>L. lactis</i>, <i>A. Iwoffii</i>, <i>S. sciuri</i>, <i>Lb. curvatus</i> und <i>J. psychrophilus</i>	83
Abb.31:Expression der OX40-L- und Jagged-1-mRNA in humanen DCs nach Einzel-oder simultaner Stimulation mit <i>L. lactis</i>, <i>A. Iwoffii</i>, <i>S. sciuri</i>, <i>Lb. curvatus</i> und <i>J. psychrophilus</i>.....	84
Abb.32:Expression der IL-5, IL-13- und GATA-3-mRNA in Kokulturen humaner DCs mit autologen T-Zellen nach Einzel-oder simultaner Stimulation mit <i>L. lactis</i>, <i>A. Iwoffii</i>, <i>S. sciuri</i>, <i>Lb. curvatus</i> und <i>J. psychrophilus</i>	86

Abbildungsverzeichnis

Abb.33:Freisetzung von IL-4 aus Kokulturen humaner DCs mit autologen T-Zellen nach Einzel-oder simultaner Stimulation mit <i>L. lactis</i>, <i>A. Iwoffii</i>, <i>S. sciuri</i>, <i>Lb. curvatus</i> und <i>J. psychrophilus</i>.....	88
Abb.34:Expression der TGF-β-mRNA in humanen DCs nach Einzel-oder simultaner Stimulation mit <i>L. lactis</i>, <i>A. Iwoffii</i>, <i>S. sciuri</i>, <i>Lb. curvatus</i> und <i>J. psychrophilus</i>	89
Abb.35:Expression der FoxP3- und TGF-β-mRNA in Kokulturen humaner DCs mit autologen T-Zellen nach Einzel-oder simultaner Stimulation mit <i>L. lactis</i>, <i>A. Iwoffii</i>, <i>S. sciuri</i>, <i>Lb. curvatus</i> und <i>J. psychrophilus</i>	90
Abb.36:Freisetzung von IL-10 aus Kokulturen humaner DCs mit autologen T-Zellen nach Einzel-oder simultaner Stimulation mit <i>L. lactis</i>, <i>A. Iwoffii</i>, <i>S. sciuri</i>, <i>Lb. curvatus</i> und <i>J. psychrophilus</i>.....	91
Abb. 37:Freisetzung von IL-6 aus humanen DCs nach Einzel- oder simultaner Stimulation mit <i>L. lactis</i>, <i>A. Iwoffii</i> und <i>S. sciuri</i>	133
Abb.38:Freisetzung von TNF-α aus humanen DCs nach Einzel- oder simultaner Stimulation mit <i>L. lactis</i>, <i>A. Iwoffii</i> und <i>S. sciuri</i>.....	134
Abb.39:Freisetzung von IL-10 aus humanen DCs nach Einzel- oder simultaner Stimulation mit <i>L. lactis</i>, <i>A. Iwoffii</i> und <i>S. sciuri</i>	135
Abb 40:Freisetzung von IL-12p70 aus humanen DCs nach Einzel- oder simultaner Stimulation mit <i>L. lactis</i>, <i>A. Iwoffii</i> und <i>S. sciuri</i>.....	136

Tabellenverzeichnis

Tab.1:Übersicht der verschiedenen T_{reg}-Subpopulationen.....	7
Tab.2:Verwendete Antikörper mit Angaben zu Isotyp, Fluorochrom, eingesetzter Verdünnung und Bezugsquelle	31
Tab.3:Spezifische Bedingungen für die Herstellung abgetöteter Kuhstallpräparate.....	32
Tab.4:Für die transiente Transfektion von HEK293-Zellen verwendete Plasmide	33
Tab.5:Aussaat und Behandlung humaner DCs in Abhängigkeit der gewählten Untersuchungsmethode	35
Tab.6:Verwendete ELISA-Kits und deren Bezugsquelle	36
Tab.7:Sequenzen der für die RT-qPCR verwendeten Oligonukleotide	37
Tab.8:Programmierung des LightCycler® zur Durchführung von RT-qPCRs.....	39
Tab.9:Auflistung der Kombinationen der drei Kuhstallisolate <i>L. lactis</i>, <i>A. Iwoffii</i> und <i>S. sciuri</i>, die für die Stimulation humaner DCs verwendet wurden	59

Anhang

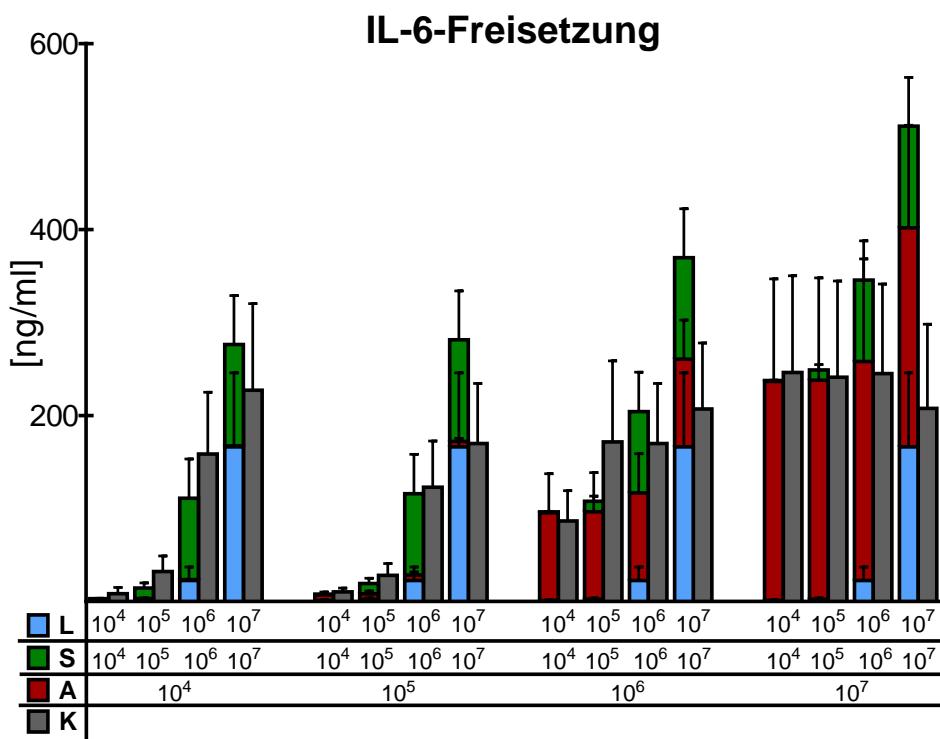
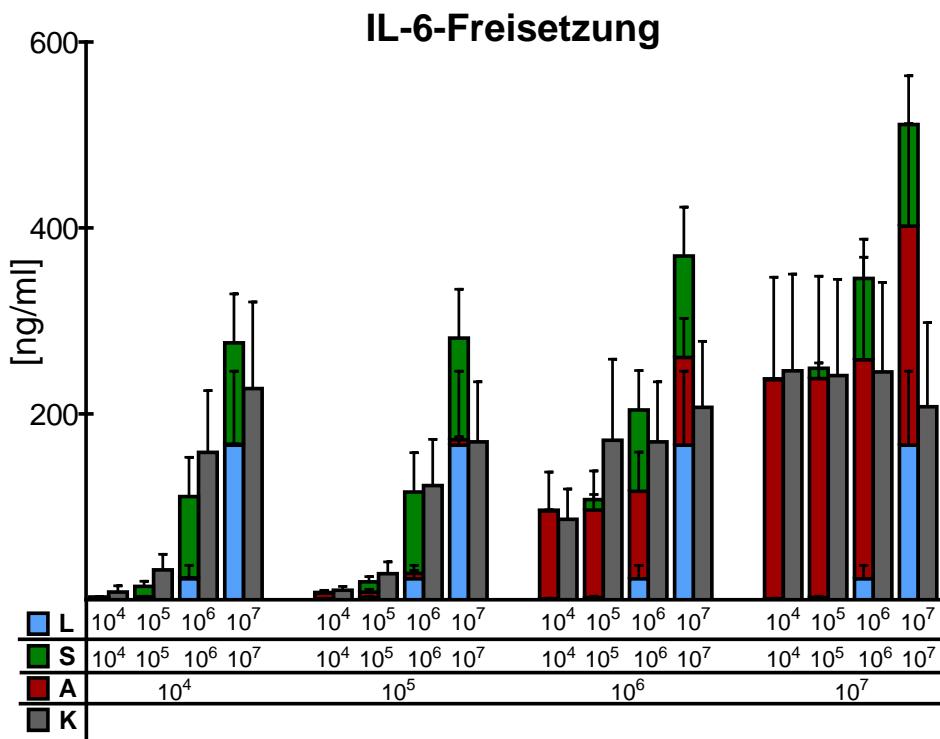


Abb.38:Freisetzung von IL-6 aus humanen DCs nach Einzel- oder simultaner Stimulation mit *L. lactis*, *A. Iwoffii* und *S. sciuri*

Humane DCs wurden entweder mit nur einem Bakterium (farbige, aufeinandergestapelte Balken; grüne Balken: *S. sciuri*, rote Balken: *A. Iwoffii*, blaue Balken: *L. lactis*; die Konzentration ist jeweils unter dem Balken in KBE/ml angegeben) oder mit einem Gemisch der drei Bakterien (graue Balken, Konzentration ergibt sich aus der Summe der Konzentrationen der Einzelstimulationen in KBE/ml) inkubiert. Nach 20h wurden die Überstände gewonnen und der Zytokingehalt mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler von n =5 Spendern.

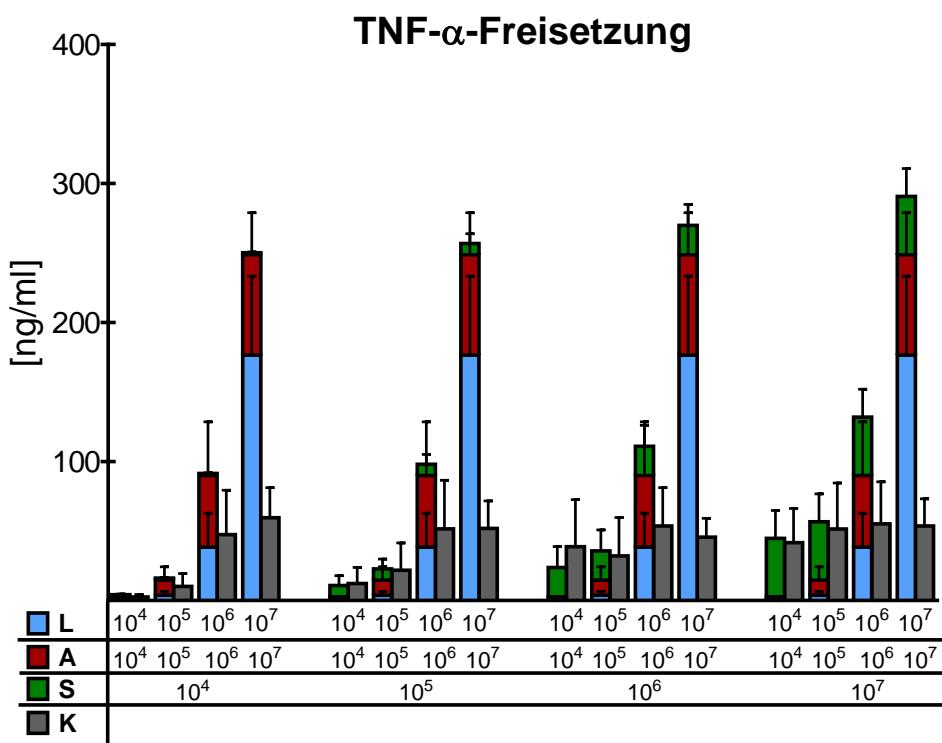
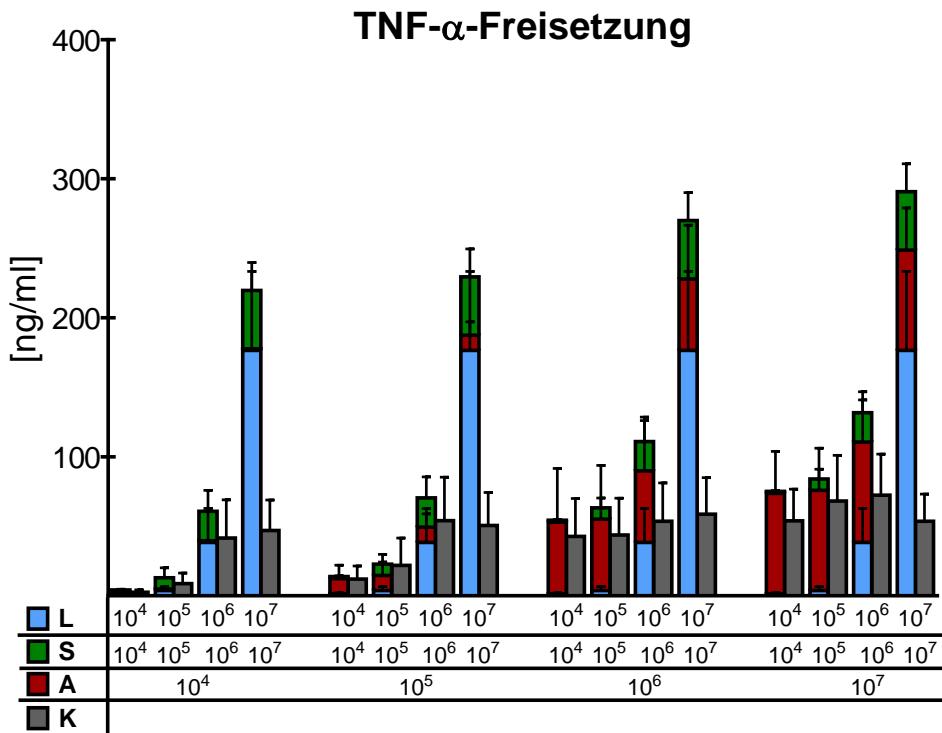


Abb.39:Freisetzung von TNF- α aus humanen DCs nach Einzel- oder simultaner Stimulation mit *L. lactis*, *A. Iwoffii* und *S. sciuri*

Humane DCs wurden entweder mit nur einem Bakterium (farbige, aufeinandergestapelte Balken; grüne Balken: *S. sciuri*, rote Balken: *A. Iwoffii*, blaue Balken: *L. lactis*; die Konzentration ist jeweils unter dem Balken in KBE/ml angegeben) oder mit einem Gemisch der drei Bakterien (graue Balken, Konzentration ergibt sich aus der Summe der Konzentrationen der Einzelstimulationen in KBE/ml) inkubiert. Nach 20h wurden die Überstände gewonnen und der Zytokingehalt mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler von n = 5 Spendern.

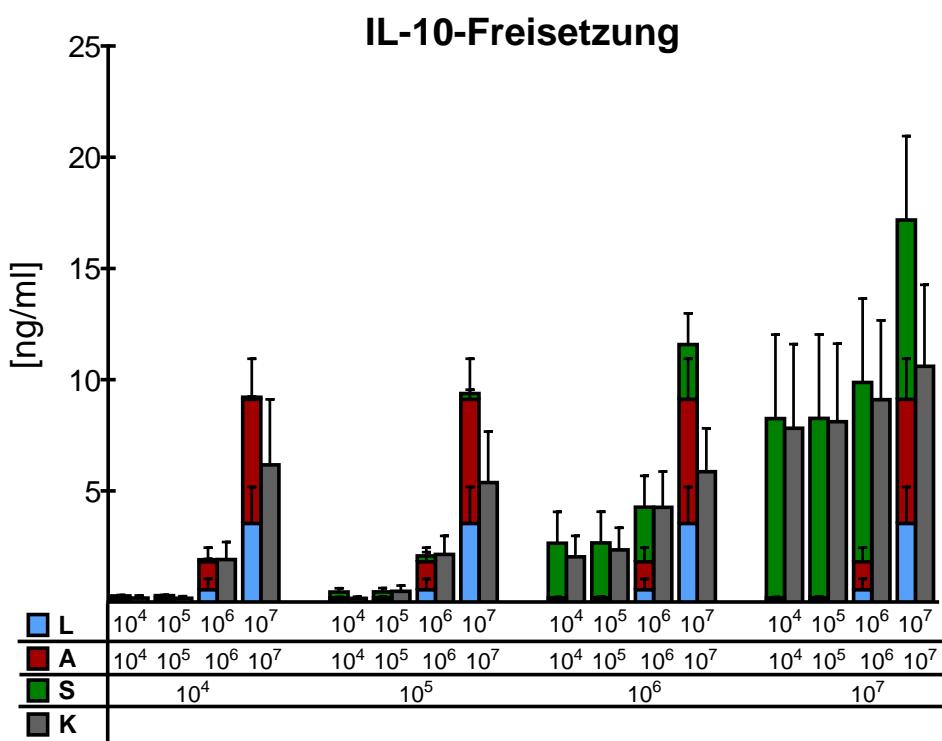
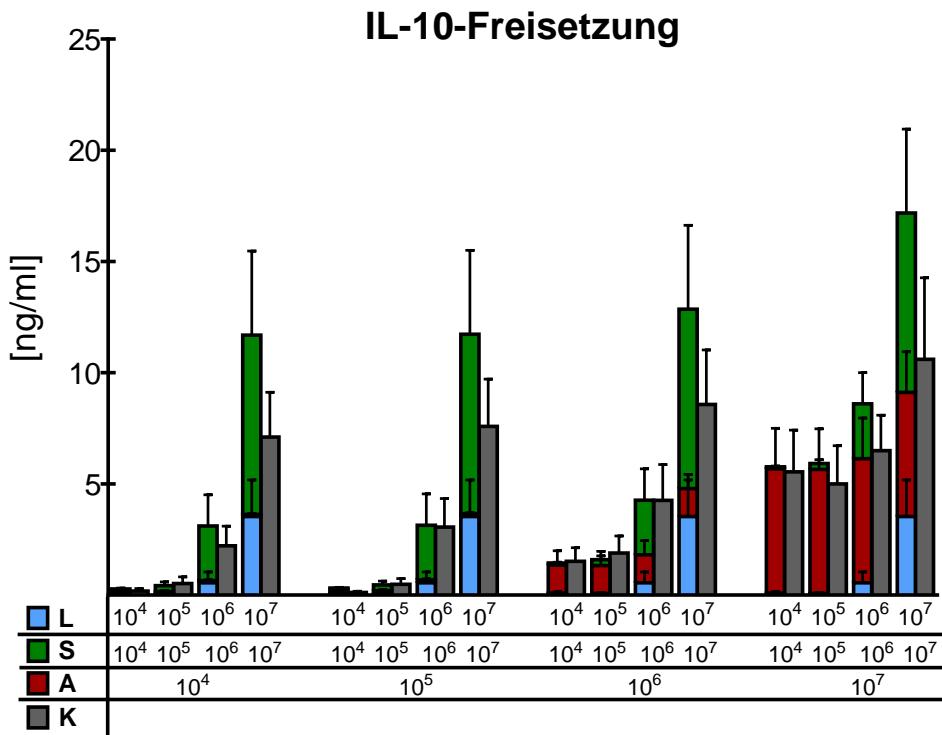


Abb.40: Freisetzung von IL-10 aus humanen DCs nach Einzel- oder simultaner Stimulation mit *L. lactis*, *A. Iwoffii* und *S. sciuri*

Humane DCs wurden entweder mit nur einem Bakterium (farbige, aufeinander gestapelte Balken; grüne Balken: *S. sciuri*, rote Balken: *A. Iwoffii*, blaue Balken: *L. lactis*; die Konzentration ist jeweils unter dem Balken in KBE/ml angegeben) oder mit einem Gemisch der drei Bakterien (graue Balken, Konzentration ergibt sich aus der Summe der Konzentrationen der Einzelstimulationen in KBE/ml) inkubiert. Nach 20h wurden die Überstände gewonnen und der Zytokingehalt mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler von n = 5 Spendern.

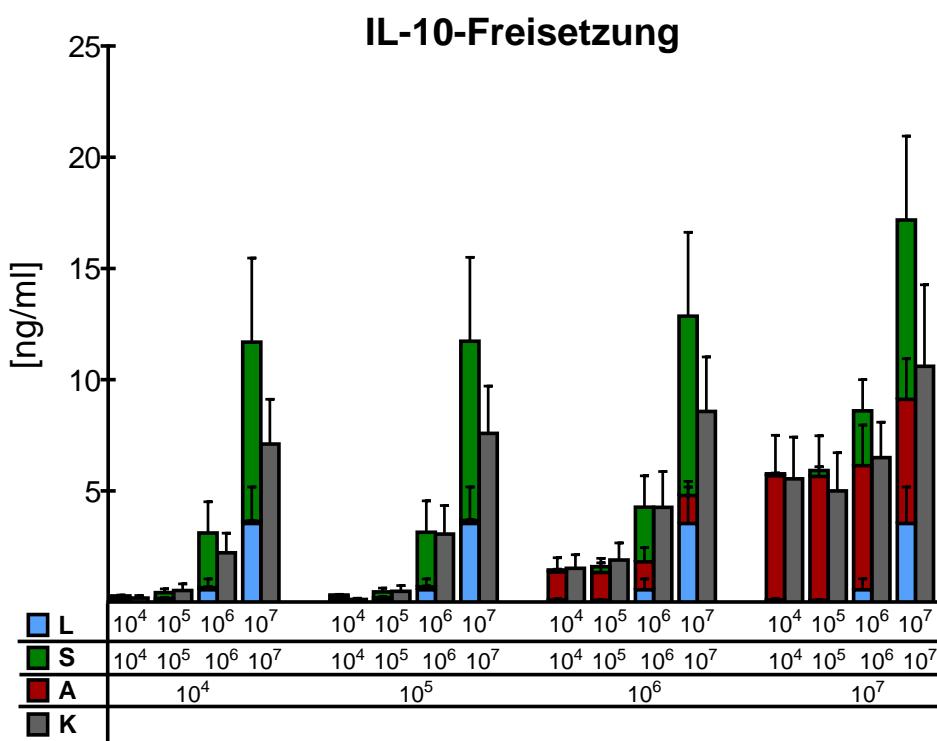
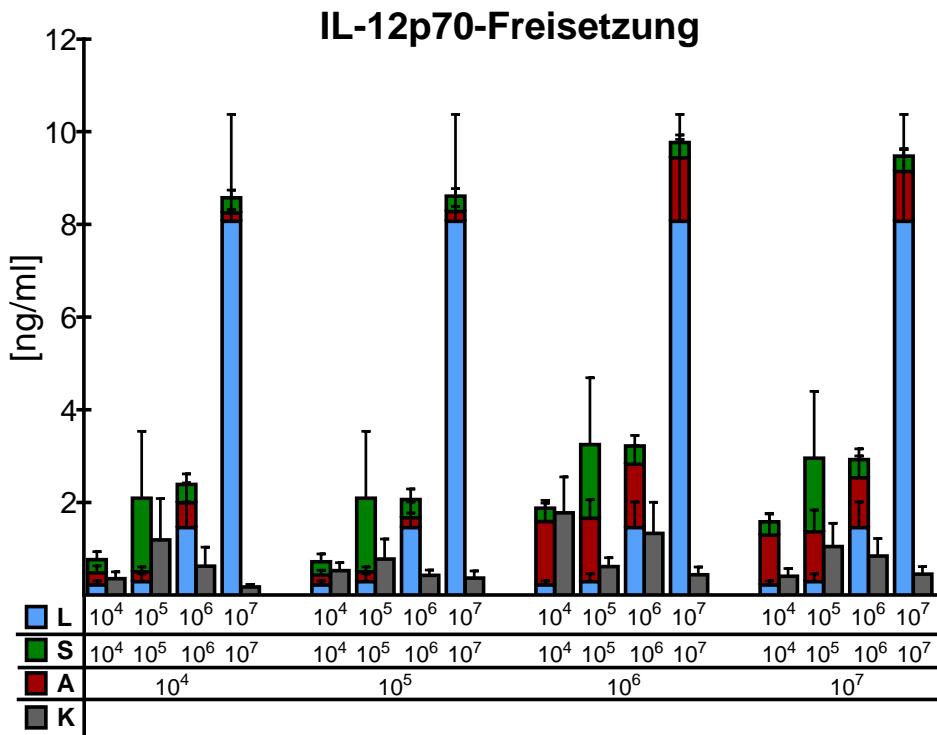


Abb. 41: Freisetzung von IL-12p70 aus humanen DCs nach Einzel- oder simultaner Stimulation mit *L. lactis*, *A. Iwoffii* und *S. sciuri*

Humane DCs wurden entweder mit nur einem Bakterium (farbige, aufeinandergestapelte Balken; grüne Balken: *S. sciuri*, rote Balken: *A. Iwoffii*, blaue Balken: *L. lactis*; die Konzentration ist jeweils unter dem Balken in KBE/ml angegeben) oder mit einem Gemisch der drei Bakterien (graue Balken, Konzentration ergibt sich aus der Summe der Konzentrationen der Einzelstimulationen in KBE/ml) inkubiert. Nach 20h wurden die Überstände gewonnen und der Zytokingehalt mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler von n = 5 Spendern.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name	Anna Störmer
Geburtstag	11.12.1986
Geburtsort	Kiel
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Promotion

seit 02/2013	Promotion am Forschungszentrum Borstel, Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
--------------	----------------------------------------------------------------------------------------------

Studium

11/2010-12/2012	Master-Studium (Biochemie) an der Christian-Albrechts-Universität (CAU) zu Kiel Masterarbeit am Forschungszentrum Borstel, Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften Titel: Synergistische Aktivierung humaner dendritischer Zellen durch Kuhstallbakterien (Note 1,3) Abschluss: <i>Master of Science</i> (Note 1,5)
10/2007-10/2010	Bachelor-Studium (Biochemie) an der CAU zu Kiel Bachelorarbeit an der CAU zu Kiel Titel: „Molekulare Klonierung, Expression und Aufreinigung der TIR-Domäne des MyD88-Homolog aus <i>Hydra magnipapillata</i> “ (Note 1,3) Abschluss: <i>Bachelor of Science</i> (Note 2,0)
10/2006-10/2007	Studium der Rechtswissenschaften an der CAU zu Kiel

Schulbildung

08/1997-07/2006	Hoffmann-von-Fallersleben Schulzentrum Lütjenburg
08/1993-07/2006	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note 1,7) Grundschule Schönberg

Veröffentlichungen

Ausgewählte Vorträge

- Störmer, A., Stein, K., Holst, O., Heine., H.
Stimulation of human dendritic cells with allergy-protective cowshed bacteria leads to synergistic activation through multiple innate recognition systems. 25. Mainzer Allergie-Workshop, Mainz, 2013
- Störmer, A., Stein, K., Holst, O., Heine., H.
Altered T cell polarizing cytokine release of human dendritic cells by combinations of allergy-protective cowshed bacteria. European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress, Kopenhagen, 2014

Ausgewählte Abstracts mit Posterpräsentation

- Störmer, A., Stein, K., Heine., H.
The allergy-protective Gram-positive cowshed bacteria *Lactococcus lactis* G121 and *Staphylococcus sciuri* W620 show differential mechanisms of immune cell activation and synergistic effects. Allergy and Asthma, Brügge 2013
- Störmer, A., Stein, K., Holst, O., Heine., H.
Does synergistic activation of human dendritic and airway epithelial cells lead to enhanced allergy-protection by different cowshed bacteria?. 43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGFI), Mainz (2013)
- Störmer, A.
Altered T cell-polarizing cytokine release of human dendritic cells by combinations of allergy-protective cowshed bacteria. 12th Spring School of Immunology (DGFI), Ettal, 2014
- Störmer, A., Stein, K., Holst, O., Heine., H.
Altered T cell-polarizing cytokine release of human dendritic cells by combinations of allergy-protective cowshed bacteria. Arbeitstagung der Norddeutschen Immunologen, Borstel 2014

Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater **Prof. Dr. Heine** meinen besonderen Dank aussprechen. Nicht nur dafür, dass du es mir überhaupt ermöglicht hast, meine Doktorarbeit unter deiner Betreuung anfertigen zu können, sondern besonders dafür, dass du mir gezeigt hast, dass auch menschliche Stärken in der Arbeitswelt zählen und dass es für jedes Problem eine Lösung gibt.

Dann möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der **Arbeitsgruppe „Angeborene Immunität“** bedanken. Durch jeden einzelnen von euch herrscht in der AG ein einzigartiges Klima, das die Arbeit zu Spaß werden lässt und einem das Gefühl gibt, unter Freunden zu sein. Jeder von euch stand mir auf seine Art und Weise mit Rat und/oder Tat zur Seite. Danke auch für die vielen Gespräche, nicht nur fachlicher Art. Besonders hervorheben möchte ich an dieser Stelle **Ina Goroncy**, die stets förmlich auf der Suche nach Arbeit war und mich durchgehend tatkräftig unterstützt hat. Ohne dich hätten meine Tage noch deutlich mehr Stunden haben müssen. Auch **Karin Uliczka** möchte ich besonders danken, da du stets ein offenes Ohr für mich hattest.

Ein Dank geht auch an die „**Borsteler Mädels**“. Danke für die vielen Stunden, in denen wir auch mal NICHT über die Arbeit geredet haben, für viel Lachen und eine Menge gutes Essen. Ich zähle euch mittlerweile definitiv zu meinen „richtigen“ Freunden ;).

Ein besonderes Wort des Dankes geht an dieser Stelle an meine **Familie- im weitesten Sinne-** und meine **Freunde**. Für eure Unterstützung und euren Beistand in jeder Lebenslage oder einfach fürs Zuhören. Ohne euch als festen Halt wäre vieles deutlich schwieriger gewesen und ich stünde nicht genau dort, wo ich mich gerade befindet. Danke auch an unseren langjährigen Freund **Jean-Jaques-Guillè**.

Mein größter Dank aber geht an **Johannes**. Ich danke dir von Herzen dafür, dass du immer für mich da bist, mich auffängst und oft auf den Boden der Tatsachen zurückholst, dafür, dass du es schaffst, mich stets zum Lachen zu bringen und mich selbst aus den dunkelsten Tälern wieder hervorholst, für dein Verständnis und deine extreme Nachsichtigkeit insbesondere in den letzten Monaten des Schreibens, in denen ich aus mehreren Gründen wirklich nicht gerade einfach war. Danke für jeden einzelnen Tag mit dir, Danke für Himbeeren und **Danke für Heinzi**.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Holger Heine ohne sonstige Hilfe selbstständig verfasst und keine weiteren als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Des Weiteren versichere ich, dass die Arbeit unter Einhaltung der Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist und weder in gleicher, noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen hat.

Kiel, März 2016, _____

(Anna Störmer)