Das *N*-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserinlacton von *Pseudomonas aeruginosa* inhibiert Funktionen humaner dendritischer Zellen

Tatiana Binder

Helmholtz Zentrum München
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt
Abteilung Mikroben-Pflanzen Interaktionen
&
Klinische Kooperationsgruppe
„Immunregulation im Kindesalter“
Dr. von Haunersches Kinderspital

HelmholtzZentrum münchen
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

März 2010

1. Gutachter: **Prof. Dr. Anton Hartmann**
2. Gutachterin: **Prof. Dr. Elisabeth Weiß**

Eingereicht am: 25. März 2010
Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juli 2010

Meiner Familie &
meinen Freunden
gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG 15
A.1. Zystische Fibrose (ZF) 15
A.2. *Pseudomonas aeruginosa* 17
A.2.1. Quorum sensing bei *P. aeruginosa* 19
A.2.2. Effekte der *N*-(Acyl)-L-Homoserinlactone 21
A.3. Das Immunsystem 23
A.3.1. Angeborenes Immunsystem 23
A.3.2. Erworbenes Immunsystem 24
A.3.3. Monozyten 25
A.3.4. Dendritische Zellen 25
A.3.4.1. Antigenpräsentation 26
A.3.4.2. Aktivierung und Polarisierung von T-Zellen 28
A.4. Ziele dieser Arbeit 30
B. MATERIAL UND METHODEN 31
Teil: Mikrobiologie
B.1. Kultivierung von Mikroorganismen 31
B.1.1. Verwendete Mikroorganismen 31
B.1.2. Herstellung von Medien und Puffern 32
B.1.3. Kultivierungsmedien 32
B.1.4. Antibiotika 33
B.1.5. Anzucht der Mikroorganismen und Stammhaltung 34
B.1.6. Keimzahlbestimmung von Bakterien 35
B.1.7. Kultivierung der Bakterien für den Phagozytosetest 35
B.2. Synthetische AHL 36
B.2.1. Herstellung und Lagerung der AHL-Aliquots 37
B.2.2. Durchführung von AHL-Biotests 37
Teil: Zellkultur
B.3. Kultivierung von humanen Zellen 38
B.3.1. Verwendete Zellen 38
B.3.2. Kultivierungsmedien 39
B.3.3. Seren 39
B.3.4. Lösungen und Reagenzien 40
B.3.5. Herstellung von Medien und Puffern 41
B.3.6. Lösungen für das Durchflusszytometer 42
B.3.7. Kulturgefäße 43
B.3.8. Verwendete Stimulanzien 43
B.3.8.1. Zytokine 43
B.3.8.2. Lipopolysaccharid 44
B.3.8.3. Jonuleit Cocktail 44
B.3.8.4. Chemokine 44
B.3.9. Verwendete Antikörper 45
B.3.9.1. Primäre Antikörper 45
B.3.9.2. Sekundäre Antikörper 45
B.3.9.3. Hybridom Antikörper 46
B.3.10. Kryokonservierung von Zelllinien 46
B.3.11. Auftauen von Zelllinen 47

B.3.12. Bestrahlung der Zellen für die Restimulation ... 47
B.3.13. Kultivierung der B-Zelllinie ... 47
B.3.14. Kultivierung und Restimulation von T-Zellklonen ... 48
B.3.15. Kultivierung der adhärent wachsenden Tumorzellen ... 48
B.3.16. Zellzählung bei humanen Zellen ... 49
B.3.17. Isolation und Generierung von humanen Zellen ... 49
B.3.17.1. Isolation von PBMZ zur Generierung von DZ ... 49
B.3.17.2. Isolation von PBMZ für den Phagozytosetest ... 50
B.3.17.3. Isolation von Monozyten ... 51
B.3.17.4. Generierung von DZ ... 51
B.3.18. Stimulation unreifer DZ in Ab- und Anwesenheit von JC bzw. LPS und den verschiedenen AHL ... 51
B.4. Färbung der DZ mit Antikörpern ... 53
B.5. Prinzip der Durchflusszytometrie ... 54
B.5.1. Anwendung der Durchflusszytometrie ... 59
B.6. Bestimmung der optimalen AHL- und LPS-Konzentration ... 61
B.7. Durchführung von Vitalitätstests mit DZ ... 61
B.8. Zytokinquantifizierung mittels Bio-Plex ... 62
B.9. Durchführung von Migrationstests ... 64
B.10. Durchführung von Phagozytosetests ... 65
B.10.1. Anfärben von Monozyten ... 67
B.10.2. Anfärben der Lysosomen von Monozyten ... 67
B.10.3. Pappenheim-Färbung der PBMZ ... 67
B.11. Mikroskopische Methoden ... 68
B.11.1. Epifluoreszenzmikroskopie ... 68
B.11.2. Hellfeldmikroskopie ... 69
B.11.3. Phasenkontrastmikroskopie ... 69
B.11.4. Stereomikroskopie ... 70
B.11.5. Konfokale Laserscanning-Mikroskopie ... 70
B.12. Nachweis der T-Zellstimulationsfähigkeit von DZ ... 72
B.13. Zytokinquantifizierung mittels ELISA ... 73
B.14. Statistische Auswertung ... 74
C. ERGEBNISSE ... 76
C.1. Keimzahlbestimmung von *P. aeruginosa* ... 76
C.2. Bestimmung der AHL-Bioaktivität ... 76
C.3. Ermittlung einer geeigneten AHL- und LPS-Konzentration für die Reifung der DZ ... 76
C.4. Vitalität der DZ unter Einfluss von AHL ... 81
C.5. Einfluss von AHL auf Oberflächenmarker exprimierende DZ ... 82
C.5.1. Stimulation der DZ mit JC und AHL ... 83
C.5.1.1. Prozentsatz der Oberflächenmarker exprimierenden DZ ... 83
C.5.1.2. MFI der Oberflächenmarker exprimierenden DZ ... 85
C.5.1.3. Vergleich des Prozentsatzes und der MFI der DZ ... 87
C.5.2. Stimulation der DZ mit LPS und AHL ... 87
C.5.2.1. Prozentsatz der Oberflächenmarker exprimierenden DZ ... 87
C.5.2.2. MFI der Oberflächenmarker exprimierenden DZ ... 90
C.5.2.3. Vergleich des Prozentsatzes und der MFI der DZ ... 92
C.5.3. Zusammenfassung des Einflusses von AHL auf die Stimulation der DZ ... 92
C.6. Einfluss von AHL auf die Expression von MHC Klasse I-Molekülen und einem Adhäsionsmolekül bei DZ ... 93

C.7. Einfluss von AHL auf die Zytokinproduktion von DZ 95
C.7.1. Zytokinproduktion von JC- und AHL-stimulierten DZ 95
C.7.2. Zytokinproduktion von LPS- und AHL-stimulierten DZ 97
C.7.3. Vergleich des Einflusses von AHL auf die Zytokinproduktion der DZ 100
C.8. Einfluss von AHL auf das Migrationsverhalten von DZ 100
C.8.1. Prozentsatz der migrierten JC- und AHL-stimulierten DZ 100
C.9. Einfluss von AHL auf das Phagozytoseverhalten von Monozyten und DZ 102
C.9.1. Phagozytosetest mit Monozyten und FITC-markierten Pseudomonaden . 102
C.9.1.1. MFI der Monozyten nach der Phagozytose 102
C.9.2. Phagozytosetest mit DZ und *P. aeruginosa* P1E-FITC 104
C.9.2.1. MFI der DZ nach der Phagozytose 104
C.9.3. Lokalisierung der phagozytierten Bakterien in den Monozyten und DZ .. 105
C.9.3.1. Detektion von *P.* spec. DSMZ 13134-GFP in den Monozyten mittels Epifluoreszenzmikroskopie 105
C.9.3.2. Detektion von *P.* spec. DSMZ 13134-GFP in den Monozyten mittels CLSM 106
C.9.3.3. Detektion der *P.* spec. DSMZ 13134-GFP in den Lysosomen der Monozyten mittels Epifluoreszenzmikroskopie 107
C.9.3.4. Detektion von *P.* spec. DSMZ 13134 in den Monozyten mittels Hellfeldmikroskopie 108
C.9.3.5. Detektion der *P. aeruginosa* P1E-FITC in den DZ mittels CLSM ... 109
C.10. Einfluss von AHL auf die T-Zellstimulationseigenschaften von DZ 109
D. DISKUSSION 111
D.1. Eigenschaften und Wirkungen der AHL 111
D.2. Produktion und Verbreitung der AHL 114
D.3. Einfluss von AHL auf DZ 117
D.3.1. Expression von Oberflächenmarkern 117
D.3.2. Zytokinproduktion 119
D.3.3. Migrationsverhalten 122
D.3.4. Phagozytoseverhalten 124
D.3.5. T-Zellstimulationseigenschaften AHL-behandelter DZ 126
E. ZUSAMMENFASSUNG 129
F. LITERATUR 133

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

C_4-HSL	*N*-(Butyryl)-L-Homoserinlacton
3oxoC_4-HSL	*N*-(3-Oxobutyryl)-L-Homoserinlacton
3oxoC_6-HSL	*N*-(3-Oxohexanoyl)-L-Homoserinlacton
C_{12}-HSL	*N*-(Dodecanoyl)-L-Homoserinlacton
3oxoC_{12}-HSL	*N*-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserinlacton
ADP	Adenosindiphosphat
AHL	*N*-(Acyl)-L-Homoserinlactone
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
ASL	engl.: Airway Surface Fluid
ATCC	engl.: American Type Culture Collection
B-LCL	engl.: B-Lymphoblastoid Cell Line
BP	engl.: Bandpass
BSA	Bovines Serum Albumin
CCR	CC Chemokin Rezeptor
CD	engl.: Cluster of Differentiation
CFU	engl.: Colony Forming Unit
CFTR	engl: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CLSM	engl.: Confocal Laser Scanning Microscope
COX	Cyclooxygenase
DIC	Differentialkontrast
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen & Zellkulturen GmbH
DZ	Dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
ELISA	engl.: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Em	Emission
ENaC	Epithelialer Natrium-Kanal
EPS	Exopolysaccharid
et al.	*et alteri*
Ex	Extinktion

FACS	engl.: Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	engl: Fetal Calf Serum
FI	engl.: Fluorescence Intensitiy
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FSC	engl.: Forward Scatter
FWD	engl.: Free Working Distance
g	engl.: Gravitation
GFP	engl.: Green Fluorescence Protein
GM-CSF	engl.: Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
Gy	Gray
HFT	Hauptfarbteiler
HLA	engl.: Human Leukocyte Antigen
$H_2O_{dem.}$	Einfach entionisiertes Wasser
H_2O_{reinst}	Entsalztes und filtriertes Wasser
HRP	engl.: Horseradish Peroxidase
HS	Humanserum
ICAM	engl.: Intercellular Adhesion Molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JC	Jonuleit Cocktail
LP	engl.: Longpass
LPS	Lipopolysaccharid
Max	Maximum
MCP	engl.: Monocyte Chemotactic Protein
MEM-NEAA	engl.: MEM Non-Essential Amino Acid Solution
MFI	engl.: Mean Fluorescence Intensity
MHC	engl.: Major Histocompatibility Complex
MIP	engl.: Macrophage Inflammatory Protein
MOI	engl.: Multiplicity of Infection
mW	Milliwatt
NFT	Nebenfarbteiler
OD	Optische Dichte

p.a.	pro analysi
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBMZ	Periphere Mononukleare Blutzellen
PBS	Phosphat-gepufferte-Saline Lösung
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein Complex
PG	Prostaglandin
pH	potentia Hydrogenii
P.I.	Propidiumjodid
PMN	Polymorphonukleare Neutrophile
PMT	Photomultiplier Tube
pO_2	Sauerstoff-Partialdruck
PQS	*Pseudomonas aeruginosa*-Quinolon Signalmolekül
QS	engl.: Quorum Sensing
RCC	engl.: Renal Cell Carcinoma
rDNA	Ribosomale Desoxyribonukleinsäure
rhu	engl.: Recombinant Human
rpm	engl.: Rounds Per Minute
RT	Raumtemperatur
SDF	engl.: Stromal Cell-Derived Factor
SSC	engl.: Sideward Scatter
TGF	engl.: Transformation Growth Factor
Th	T-Helfer-Zelle
TLR	engl.: Toll-Like Receptor
TMB	Tetramethylbenzin
TNF	engl.: Tumor-Necrosis Factor
Treg	Regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zellrezeptor
ÜN	Über Nacht
w/o	without
ZF	Zystische Fibrose
ZTL	Zytotoxische T-Lymphozyten

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung A.1: Darstellung einer Lungenepithelzelle eines gesunden Menschen (A.) gegenüber eines ZF-Patienten (B.)

Abbildung A.2: Virulenzfaktoren von *Pseudomonas aeruginosa*

Abbildung A.3: Hierarchische Anordnung des Quorum sensing (QS)-Regulons in *Pseudomonas aeruginosa*

Abbildung A.4: Darstellung allgemeiner Strukturen der *N*-(Acyl)-L-Homoserinlactone

Abbildung A.5: Änderungen der funktionellen Eigenschaften einer DZ

Abbildung A.6: Interaktion einer naiven T-Zelle mit einer DZ

Abbildung B.1: Phasenauftrennung nach der Dichtegradientenzentrifugation

Abbildung B.2: Phasenkontrastaufnahmen von humanen Zellen

Abbildung B.3: Darstellung des Seitwärtsstreulichts und Vorwärtsstreulichts

Abbildung B.4: Exemplarische Punktwolkendarstellung der Zellpopulationen

Abbildung B.5: Exemplarische Quadrantenanalyse des P2 Gates

Abbildung B.6: Exemplarischer Vergleich zwischen den P2 Gates ohne bzw. mit Trypanblau

Abbildung B.7: Exemplarischer Vergleich zwischen der Quadrantenanalyse des P2 Gates ohne bzw. mit Trypanblau

Abbildung B.8: Exemplarische Darstellung der Datensätze in Histogrammen

Abbildung B.9: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme von PBMZ inkubiert mit *Pseudomonas* spec. DSMZ 13134

Abbildung B.10: Darstellung des Pipettierschemas für die T-Zellstimulation

Abbildung C.1: Expression der Maturationsmarker (% relativ zu LPS=100%) nach der Stimulation der DZ mit 0,05 µg/ml LPS und den AHL in der Konzentration 100 µM.

Abbildung C.2: Expression der Maturationsmarker (% relativ zu LPS=100%) nach der Stimulation der DZ mit 0,05 µg/ml LPS und den AHL in den Konzentrationen 0,1 µM, 1 µM, 10 µM und 100 µM.

Abbildung C.3: Expression der Maturationsmarker (% relativ zu LPS=100%) nach der Stimulation der DZ ohne bzw. mit 0,1 µg/ml LPS und den AHL in den Konzentrationen 10 µM, 30 µM, 60 µM, 100 µM.

Abbildung C.4: Vitalität der DZ, dargestellt anhand der Fluoreszenzintensität (relativ zu w/o=100%) nach der Stimulation der DZ ohne bzw. mit JC und den AHL in der Konzentration 60 µM.

Abbildung C.5: Expression der Maturations- und Migrationsmarker (% relativ zu JC=100%) nach der Stimulation der DZ ohne bzw. mit JC und den AHL in der Konzentration 60 µM.

Abbildung C.6: Expression der Maturations- und Migrationsmarker (MFI relativ zu JC=100%) nach der Stimulation der DZ ohne bzw. mit JC und den AHL in der Konzentration 60 µM.

Abbildung C.7: Expression der Maturations- und Migrationsmarker (% relativ zu LPS=100%) nach der Stimulation der DZ ohne bzw. mit LPS und den AHL in der Konzentration 60 µM.

Abbildung C.8: Expression der Maturations- und Migrationsmarker (MFI relativ zu LPS=100%) nach der Stimulation der DZ ohne bzw. mit LPS und den AHL in der Konzentration 60 µM.

Abbildung C.9: Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1, sowie HLA-A2 und HLA-ABC der Nierenzellkarzinomlinie RCC-26.

Abbildung C.10: Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1, sowie HLA-A2 und HLA-ABC nach Behandlung der DZ mit den AHL in der Konzentration 60 µM.

Abbildung C.11: Analyse der Produktion der Zytokine (relativ zu JC=100%) nach der Stimulation der DZ ohne bzw. mit JC und den AHL in der Konzentration 60 µM.

Abbildung C.12: Analyse der Produktion der Zytokine (relativ zu LPS=100%) nach der Stimulation der DZ ohne bzw. mit LPS und den AHL in der Konzentration 60 µM.

Abbildung C.13: Migrationsverhalten ohne bzw. mit Chemokin 100 ng/ml CXCL12 (% relativ zu JC=100%) nach der Stimulation DZ mit JC und den AHL in der Konzentration 60 µM.

Abbildung C.14: Phagozytoserate von *Pseudomonas* spec. DSMZ 13134 (Pspec) ohne bzw. mit Trypanblau (MFI relativ zu Pspec=100%) nach der Behandlung der Monozyten mit den AHL in der Konzentration 60 µM.

Abbildung C.15: Phagozytoserate von *Pseudomonas aeruginosa* P1E (Pae) ohne bzw. mit Trypanblau (MFI relativ zu Pae=100%) nach der Behandlung der Monozyten mit den AHL in der Konzentration 60 µM.

Abbildung C.16: Phagozytoserate von *Pseudomonas aeruginosa* P1E (Pae) ohne bzw. mit Trypanblau (MFI relativ zu Pae=100%) nach der Behandlung der DZ mit den AHL in der Konzentration 60 µM.

Abbildung C.17: Epifluoreszenzaufnahmen der GFP-markierten *Pseudomonas* spec. DSMZ 13134 nach der Phagozytose durch PE-gefärbte Monozyten.

Abbildung C.18: CLSM-Aufnahme von GFP-markierten *Pseudomonas* spec. DSMZ 13134 und Monozyten.

Abbildung C.19: Epifluoreszenzaufnahmen der Kolokalisierung der GFP-markierten *Pseudomonas* spec. DSMZ 13134 mit den Lysosomen nach der Phagozytose durch Monozyten.

Abbildung C.20: Hellfeldmikroskopische Aufnahme einer Pappenheim-Färbung eines Monozyten, welcher ohne bzw. mit *Pseudomonas* spec. DSMZ 13134 inkubiert wurde.

Abbildung C.21: Ansicht einer einzelnen Schnittebene aus einem z-Stapel einer DZ (ungefärbt) nach der Inkubation mit FITC-markierten P*seudomonas aeruginosa* P1E und Zugabe von Trypanblau.

Abbildung C.22: IFN-gamma Zytokinproduktion (pg/ml) der JB4-ZTL nach Kokultivierung mit AHL-behandelten DZ (AHL-Konzentration 60 µM).

Abbildung D.1: Einfluss von 3oxoC_{12}-HSL auf die Funktionen einer DZ

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle B.1: Verwendete Mikroorganismen

Tabelle B.2: Verwendete Antibiotika

Tabelle B.3: Synthetische *N*-(Acyl)-L-Homoserinlactone

Tabelle B.4: Verwendete Zytokine

Tabelle B.5: Verwendetes LPS zur Reifung der DZ

Tabelle B.6: Zusammensetzung des definierten Jonuleit Cocktails zur Reifung der DZ

Tabelle B.7: Verwendetes Chemokin zur Migration der DZ

Tabelle B.8: Verwendete primäre Antikörper

Tabelle B.9: Verwendete sekundäre Antikörper

Tabelle B.10: Verwendete primäre Hybridom-Antikörper

Tabelle B.11: Verwendete Anzahl der Restimulationszellen

Tabelle B.12: 4-Farben Färbung mit Antikörpern für die Oberflächenmarker

Tabelle B.13: 4-Farben Färbung mit Antikörpern für die Oberflächenmarker inklusive Migrationsmarker

Tabelle B.14: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe in der Durchflusszytometrie

Tabelle B.15: Expressionsmuster der Oberflächenmarker bei unreifen und reifen DZ

Tabelle B.16: Verwendeter Kit für den Vitalitätstest

Tabelle B.17: Verwendeter Kit für die Zytokinquantifizierung

Tabelle B.18: Inkubationsdauer, verwendete Organismen und MOI für den Phagozytosetest mit humanen Zellen

Tabelle B.19: Kenndaten der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sowie entsprechende Filtersätze bei der Epifluoreszenzmikroskopie

Tabelle B.20: Kenndaten des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes, sowie entsprechendem Filtersatz bei der Stereomikroskopie

Tabelle B.21: Kenndaten der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und entsprechende Laser, Strahlenteiler und Filter bei der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie (LSM-510)

Tabelle B.22: Kenndaten der verwendeten Fluoreszenzfarbstoff und entsprechende Laser, Kondensor und Filter bei der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie (FluoView FV 1000)

Tabelle B.23: Verwendeter Kit für den ELISA

Tabelle B.24: Signifikanzgrenzen der Testverfahren

A. EINLEITUNG

A.1. Zystische Fibrose (ZF)

Zystische Fibrose, auch Mukoviszidose genannt (Übersicht in Davis, P. B. 2006), gilt als die schwerwiegendste autosomal-rezessiv vererbbare Stoffwechselkrankheit in der kaukasischen Bevölkerung. Die Häufigkeit der Erkrankung liegt bei 1:2500 (Campana, S. *et al.* 2004) und beruht auf einer Mutation in einem Gen (Riordan, J. R. *et al.* 1989; Kerem, B. *et al.* 1989; Rommens, J. M. *et al.* 1989), welches für das Transmembranprotein mit der Bezeichnung „Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator" (CFTR) kodiert. Dieses Protein ist ein Chlorid-ABC Transporter mit regulatorischer Funktion, welches in der apikalen Membran von Epithelzellen vorkommt (Bear, C. E. *et al.* 1992; Dorwart, M. *et al.* 2004). Es transportiert Chlorid-Ionen aus der Zelle und reguliert epitheliale Natrium-Kanäle (ENaC) (Boucher, R. C. *et al.* 1986; Stutts, M. J. *et al.* 1995). Da Chlorid-Ionen osmoaktiv sind, bewirken sie das Austreten von Wasser aus der Zelle in das umgebende Gewebe. Durch den defekten, oft vollständig inaktiven CFTR werden bei ZF-PatientInnen vermehrt Natrium-Ionen absorbiert und Chlorid-Ionen vermindert ausgeschleust. Durch diese Dysregulation ist der extrazelluläre Wassergehalt zu niedrig, so dass die Körpersekrete zähflüssig werden (Abbildung A.1). Die erhöhte Viskosität der epithelialen Sekrete verursacht viele Funktionsstörungen in den Organen. Hauptsächlich betroffen ist der Magen-Darm Trakt, der Pankreas und die Lunge. Die Überlebensprognose hängt vor allem von den pulmonalen Komplikationen ab. Über die Pathogenese und die hohe Empfänglichkeit für chronisch pulmonale Infektionen und Entzündungen gibt es mehrere Hypothesen. Eine ältere Theorie ist, dass aufgrund der defekten CFTR die ASL (Airway Surface Fluid) hyperton ist und somit die Salz-sensiblen Defensine inaktiviert werden. Die ASL bedeckt die Lungenoberfläche und besteht aus einer Mucusschicht (stark vernetzte, hochglykosylierte Proteine) und einer periziliären Flüssigkeitsschicht, welche die Zilien des Flimmerepithels umgibt und wenig viskös ist, damit die Zilien sich schnell bewegen können. Zusätzlich schützt sie die Epithelschicht vor der darüberliegenden Mucusschicht. Diese Hemmung des angeborenen Immunsystems führt zu einer Vermehrung der Mikroorganismen (Zabner, J. *et al.* 1998; Übersicht in McAuley, D. F. *et al.* 2000). In einer neueren Hypothese wird vermutet, dass es zu einer Volumenabnahme der periziliären Flüssigkeitsschicht durch die Dysregulation der Ionenkanäle bei den ZF-PatientInnen

kommt. Dies führt zu einer Interaktion der Mucusschicht mit der Epitheloberfläche und es bilden sich so genannte „Mucusplaques“. Dadurch wird die Zilienbewegung verringert, die mukoziliäre Clearance beeinträchtig und es kommt zu Atemwegsobstruktionen und damit verbunden zu einer Störung der primären natürlichen Abwehr (Übersicht in McAuley, D. F. *et al.* 2000 und Knowles, M. R. *et al.* 2002). Dieses Habitat schafft optimale Bedingungen für opportunistische Mikroorganismen. Durch Kolonisation entstehen im Laufe der Zeit chronisch bakterielle Infektionen (Boucher, R. C. 2002). Folgen solcher chronisch progressiven bronchopulmonalen Infektionen sind meist Bronchiektasien mit anschließend respiratorischer Insuffizienz (Balough, K. *et al.* 1995). 90% der Mukoviszidose-PatientInnen sterben an Lungenversagen (Rajan, S. *et al.* 2002). *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenza* sind die hauptsächlichen Erreger in der Lunge von ZF-PatientInnen (Govan, J. R. *et al.* 1996; Tummler, B. *et al.* 1999; Rajan, S. *et al.* 2002), wobei *Pseudomonas aeruginosa* als ZF-Leitkeim bezeichnet wird, da 80% der Erwachsenen ZF-PatientInnen besiedelt sind (Übersicht in Lyczak, J. B. *et al.* 2002 und O'Malley, C. A. 2009).

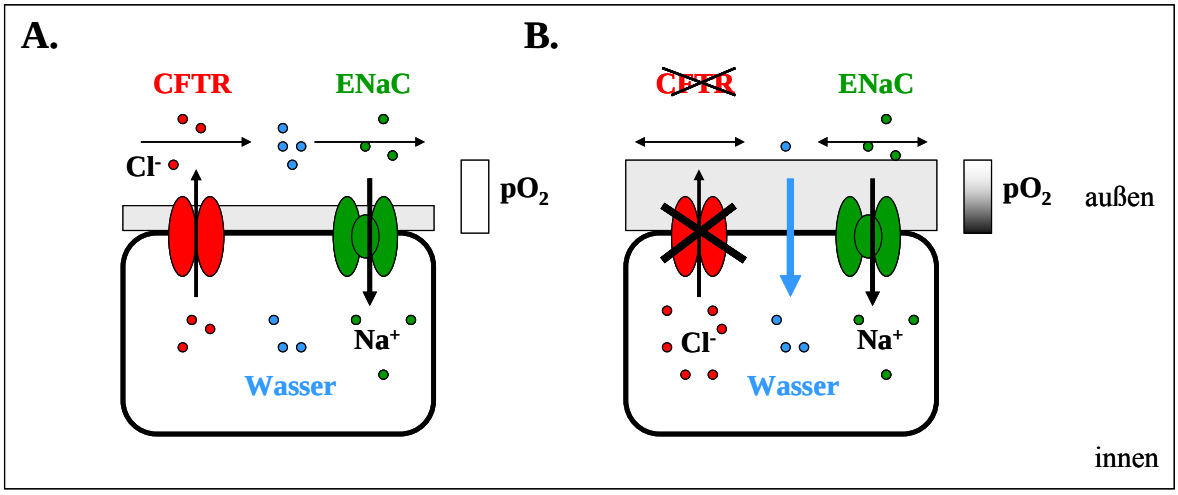


Abbildung A.1: Darstellung einer Lungenepithelzelle eines gesunden Menschen **(A.)** gegenüber eines ZF-Patienten **(B.)**. Die durch Mutation hervorgerufene Fehlfunktion des Chlorid-ABC Transporters CFTR von ZF-PatientInnen führt zur Störung des Na^+- und Cl^- Haushaltes der Lungenepithelzellen. Erhöhte Salzkonzentrationen in der Zelle führen zu einem Entzug von Wasser im Mucus; die Viskosität des Mucus ist erhöht. Somit ist der Abtransport des Mucus erschwert und es kommt zu einer verschlechterten Sauerstoffdiffusion in die Zellen. Diese Situation entspricht einem idealen Habitat für Mikroorganismen.

A.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Das opportunistisch pathogene Gram-negative Stäbchenbakterium stellt den Hauptgrund der Morbidität und Mortalität bei ZF-PatientInnen dar. Der Keim gehört zu den gamma-Proteobakterien und ist ein oligotrophes Bakterium, da er viele Substrate verwerten und unter extrem nährstoffarmen Bedingungen überleben kann (Anzai, Y. *et al.* 2000). Er ist sowohl Katalase- als auch Oxidase-positiv und obwohl er als obligat aerob klassifiziert ist, ist *P. aeruginosa* in der Lage, Elektronen auf oxidierte Stickstoffverbindungen (NO_2^-, NO, N_2O) (Zumft, W. G. 1997), Pyruvat oder Arginin zu übertragen und somit auch unter anaeroben Bedingungen zu wachsen (Eschbach, M. *et al.* 2004; Vander Wauven, C. *et al.* 1984; Luthi, E. *et al.* 1986). Seine Größe bewegt sich zwischen 1,5-5,0 x 0,5-1,0 µm. Zu den unverwechselbaren Eigenschaften zählt unter anderem der süßlich-aromatische „lindenblütenartige" Geruch, der durch die Bildung von o-Aminoacetophenon hervorgerufen wird. *P. aeruginosa* bildet 2 Pigmente: das blaugrüne Pyocyanin und das gelbgrüne Siderophor Pyoverdin, auch Fluoreszein genannt. Weiterhin verfügt das Bakterium über Flagellen und Pili, die ihm die Motilität und Adhäsion ermöglichen (Übersicht in Wilson, R. *et al.* 1998 und Sadikot, R. T. *et al.* 2005). Bakterien der Art kommen ubiquitär in einer Vielzahl von Boden- und Wasserhabitaten vor; sie können Menschen, Tiere und Pflanzen besiedeln. Als so genannter „Nass- und Pfützenkeim" können unter anderem Leitungswasser, Waschbecken, Luftbefeuchter, Infusionsschläuche, Beatmungsgeräte, aber auch Kosmetika, Pflanzen, Tiere und Lebensmittel mögliche Infektionsquellen darstellen (Bonten, M. J. *et al.* 1999; Spiers, A. J. *et al.* 2000; Nseir, S. *et al.* 2002). Er gehört zu den am häufigsten vorkommenden Verursachern von nosokomialen Infektionen. Bei einem systemisch oder lokal geschwächten Immunsystem kann es zu folgenschweren Infektionen kommen. *P. aeruginosa* produziert eine ganze Reihe von Virulenzfaktoren, die für die Entstehung lokaler Gewebeläsionen, die Invasion und Verbreitung der Bakterien und die Zerstörung verschiedener Bestandteile der Immunabwehr mit verantwortlich sind. Zu den Hauptvirulenzfaktoren (Abbildung A.2) gehört Exotoxin A, eine ADP-Ribosyltransferase, die durch Hemmung des Elongationsfaktors 2 die Proteinbiosynthese unterbindet, was zum eukaryotischen Zelltod führt. Des Weiteren gehört das Typ III Proteinsekretionssystem zu den Pathogenitätsfaktoren. Dieses befähigt die Bakterien, Effektorproteine über eine Art Nadelstruktur oder Pore direkt in die eukaryotische Zielzelle einzuschleusen (Feltman, H.

et al. 2001). Weitere Virulenzfaktoren sind Hämolysine (Rhamnolipid und Phospholipase C), Proteasen (Elastase A und B, alkalische Protease), sowie Lipopolysaccharide (LPS) und Alginat, ein komplexes Exopolysaccharid, welches zum Schutz vor äußeren Einflüssen gebildet wird (Übersicht in Wilson, R. *et al.* 1998).

Eine erhöhte Alginatproduktion findet unter anaeroben Bedingungen statt (Hassett, D. J. 1996). Inhalierte, nicht-mucoide *P. aeruginosa* dringen aktiv in Mucusplaques ein, binden dort und bilden in den niedrigen Sauerstoffpartialdruck aufweisenden Schichten Mikrokolonien aus. Durch die Proliferation der Bakterien und den Aufbau einer aus verschiedenen extrazellulären Polysacchariden (EPS) bestehenden Matrix sowie die Ausscheidung des Virulenzfaktors Alginat wird die Diffusion von Sauerstoff weiterhin erschwert und der Sauerstoffgradient verschiebt sich von mikroaerob zu anaerob. Mucoide, nicht-mobile Phänotypen des *P. aeruginosa*-Stammes entwickeln sich (Hassett, D. J. 1996; Worlitzsch, D. *et al.* 2002; Bragonzi, A. *et al.* 2005). EPS und Alginat in den Biofilmen führen zu einer erhöhten Antibiotikaresistenz des Stammes und tragen zum Schutz vor Phagozytose bei, da opsonierende Antikörper und Phagozyten weniger Angriffsfläche finden; dies führt zu persistierenden und chronischen Infektionen in der ZF-Lunge (Schwarzmann, S. *et al.* 1971; Baltimore, R. S. *et al.* 1987; Mahenthiralingam, E. *et al.* 1994; Singh, P. K. *et al.* 2000; Whiteley, M. *et al.* 2001; Übersicht in Hoiby, N. *et al.* 2001 und Murray, T. S. *et al.* 2007).

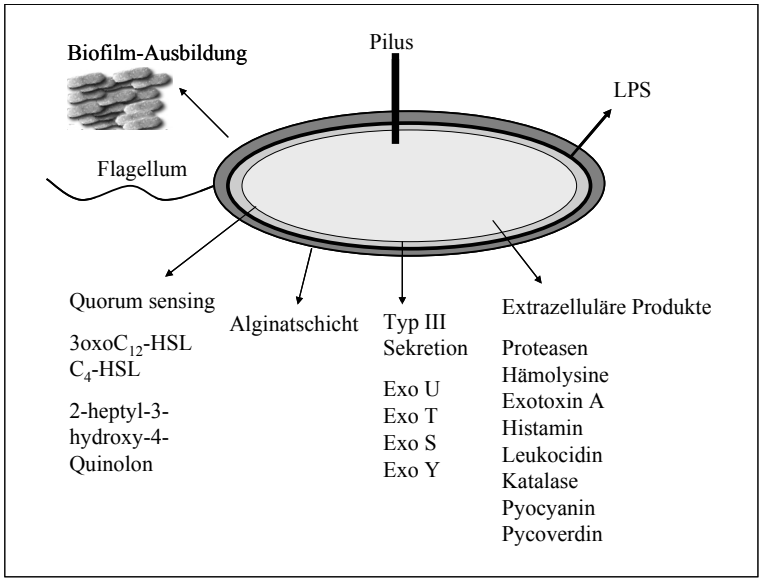


Abbildung A.2: Virulenzfaktoren von *Pseudomonas aeruginosa*

A.2.1. Quorum sensing bei *P. aeruginosa*

Die Expression der extrazellulären Virulenzfaktoren, welche entscheidend für das pathogene Potential des *P. aeruginosa* Stammes verantwortlich sind, wird über Quorum sensing (QS) gesteuert (Fuqua, C. *et al.* 1996). Als QS wird ein dichteabhängiges, interzelluläres Kommunikationssystem bei Bakterien bezeichnet. Ferner ist die Kommunikation zwischen verschiedenen Bakterienstämmen, *P. aeruginosa* und *Burkholderia cepacia*, in der ZF-Lunge nachweisbar (Lewenza, S. *et al.* 2002; Eberl, L. *et al.* 2004), wobei die Kommunikation unidirektional von *P. aeruginosa* zu *B. cepacia* erfolgt (Riedel, K. *et al.* 2001).
Durch die Koordination und Synchronisation der Expression der Virulenzgene einer gesamten Bakterienpopulation werden die Pathogenitätsfaktoren erst ab einer gewissen Zelldichte sekretiert. Der Vorteil liegt darin, dass ein „Angriff" auf den Wirt erst dann erfolgt, wenn die Population (so genanntes „Quorum") ausreichend groß ist, um den Wirt effektiv zu schädigen bzw. Abwehrmechanismen zu überwinden und um sich so im Wirtsorganismus ausbreiten zu können. Eine frühzeitige Produktion von Virulenzfaktoren würde dazu führen, dass der Wirt genügend Zeit hat, geeignete Abwehrmechanismen einzuleiten und die Infektion zu bekämpfen.

Wie von Pesci und Kollegen gezeigt worden war, existieren bei *P. aeruginosa* zwei, miteinander interagierende QS-Systeme, Las und Rhl (Abbildung A.3) (Pesci, E. C. *et al.* 1997). Beide Systeme bestehen aus einem Transkriptionsregulator (LasR bzw. RhlR) und einer Signalmolekül-Synthase (LasI und RhlI) (Passador, L. *et al.* 1993; Ochsner, U. A. *et al.* 1995). Diese Enzyme katalysieren die Synthese so genannter „acylierter Homoserinlactone", die als kleine, diffundierbare Signalmoleküle agieren. Das LasR-LasI System bildet das langkettige, Oxo-substituierte *N*-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserinlacton (3oxoC_{12}-HSL) (Abbildung A.4 E.). Es besteht aus dem *lasI*-Gen, das für die Synthese des *N*-(Acyl)-L-Homoserinlactons (AHL), auch Autoinducer genannt, verantwortlich ist und dem *lasR* Gen, welches den Transkriptionsaktivator kodiert. (Pearson, J. P. *et al.* 1994). Der Transport dieses Signalmoleküls in und aus der Bakterienzelle erfolgt über langsame Diffusion und mit Hilfe einer aktiven Efflux-Pumpe (Pearson, J. P. *et al.* 1999). Das RhlR-RhlI System synthetisiert den kurzkettigen Autoinducer *N*-(Butanoyl)-L-Homoserinlacton (C_4-HSL) (Abbildung A.4 D.) (Pearson, J. P. *et al.* 1995). Die Regulationseinheit besteht

aus dem Autoinducer-Synthasegen *rhlI* und dem für den Transkriptionsaktivator kodierenden Gen *rhlR*. Das C_4-HSL Molekül ist frei permeabel und kann die Bakterienmembran über passive Diffusion in beide Richtungen ungehindert passieren (Pearson, J. P. *et al.* 1999). Durch Bindung des 3oxoC_{12}-HSL bzw. C_4-HSL an den entsprechenden Transkriptionsaktivator (LasR und RhlR) entsteht ein transkriptionsregulatorischer Komplex. Es kommt zur verstärkten Transkription von *lasI* und *rhlI* und damit zum rapiden Anstieg an verfügbarem Autoinducer. Dies führt zur Induktion der Transkription von hunderten Quorum sensing induzierbaren Genen auf dem *P. aeruginosa* Genom (Schuster, M. *et al.* 2003; Wagner, V. E. *et al.* 2003).

Die beiden Systeme unterliegen einer hierarchischen Anordnung, wobei das LasR-LasI System das RhlR-RhlI System kontrolliert (Abbildung A.3) (Pesci, E. C. *et al.* 1997). Eine Aktivierung des LasR-LasI Systems zieht eine Aktivierung des RhlR-RhlI Systems nach sich, da der LasR/3oxoC_{12}-HSL-Komplex nicht nur die Expression von *lasI*, sondern auch die *rhlR*-Expression aktiviert. Die Transkription des LasR-LasI Systems wird durch die globalen, übergeordneten Regulatoren Vfr (Albus, A. M. *et al.* 1997) und GacA, ein hoch konservierter Zwei-Komponenten Antwortregulator, positiv reguliert. GacA kann ebenfalls das RhlR-RhlI System induzieren (Reimmann, C. *et al.* 1997).

Es wurde auch ein Repressor (RsaL) für die *lasI*-Expression beschrieben; er hat eine große Auswirkung auf die Expression von LasR-3oxoC_{12}-HSL abhängigen Virulenzgenen (de Kievit, T. *et al.* 1999). Das RhlR-RhlI System wird des Weiteren positiv über das *Pseudomonas*-Quinolon Signalmolekül (PQS) (McKnight, S. L. *et al.* 2000) sowie negativ durch den Transkriptionsregulator MvaT reguliert (Diggle, S. P. *et al.* 2002).

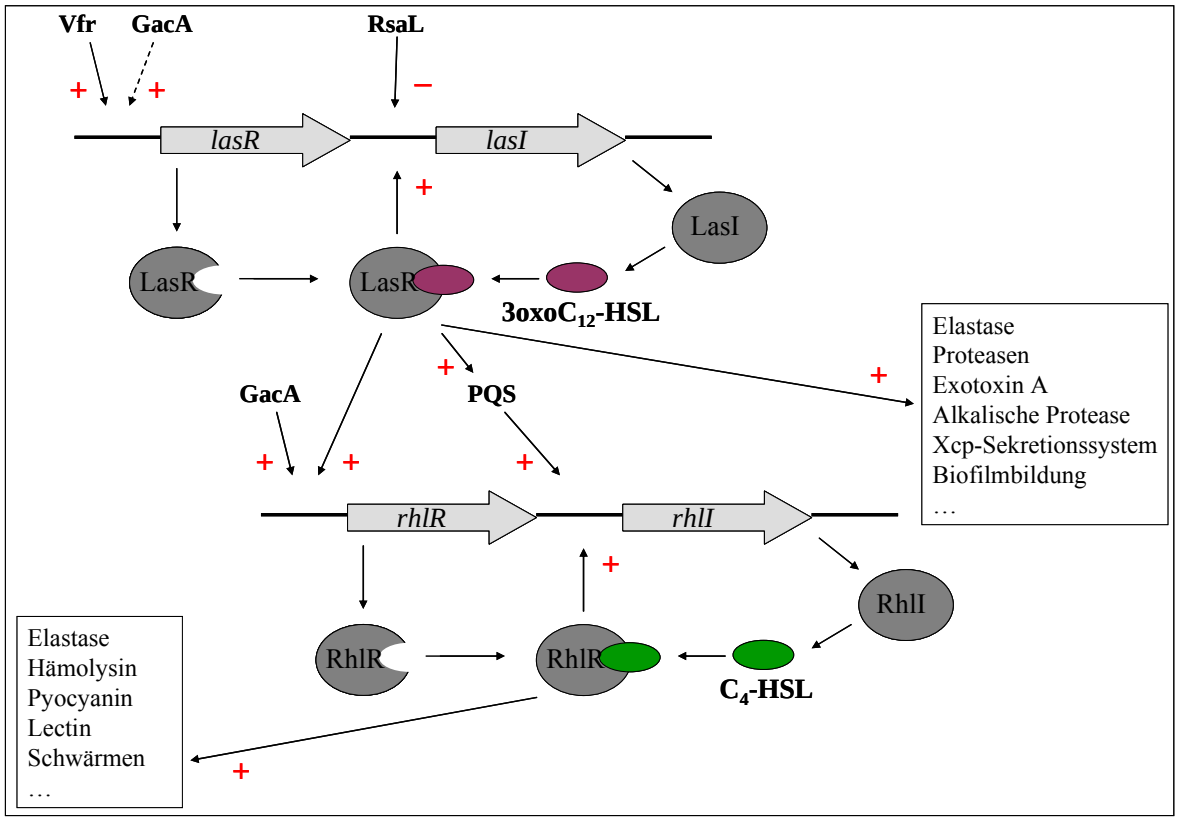


Abbildung A.3: Hierarchische Anordnung des Quorum sensing (QS)-Regulons in *Pseudomonas aeruginosa*. Das QS-Regulon ist aus dem Las- und dem Rhl-System aufgebaut, bestehend aus jeweils einem Transkriptionsregulator (LasR, RhlR) und einer Autoinducer-Synthase (LasI, RhlI). Die durch Synthasen gebildeten Autoinducer 3oxoC_{12}-HSL (LasI) und C_4-HSL (RhlR) binden bei Erreichen einer Schwellenwertkonzentration an die zughörigen Regulatoren und bilden transkriptionsregulatorische Komplexe, die ihrerseits die Transkription der angegebenen Zielgene induzieren. Die aktivierten Gene induzieren sowohl die Synthese der Signalmoleküle (Autoinduktion), als auch die Expression verschiedener Virulenzfaktoren. Dabei ist das Las-System dem Rhl-System übergeordnet. Die QS-Systeme werden über die übergeordneten, global reprimierenden Virulenzregulator Vfr, sowie GacA, RsaL und das *Pseudomonas*-Quinolon Signalmolekül (PQS) reguliert. Zusätzlich wird das Rhl-System negativ durch den Transkriptionsregulator MvaT gesteuert (nicht dargestellt).

A.2.2. Effekte der *N*-(Acyl)-L-Homoserinlactone

Derivate der AHL von Gram-negativen Bakterien besitzen verschieden lange Alkanoyl-Seitenketten (4-18 Kohlenstoffatome). Die verschiedenen AHL zeigen deshalb unterschiedlich hydrophile Eigenschaften. Die Kohlenstoffseitenkette kann an Position C_3 eine Oxo-, Hydroxy- oder keine Substitution enthalten (Abbildung A.4 A.B.C.). Der Lactonring ist bei allen AHL sehr instabil. Vor allem unter alkalischen Bedingungen oder durch biologische Zersetzung (Lactonasen, Hydrolasen) kommt es schnell zur Hydrolyse (Englmann, M. *et al.* 2007).

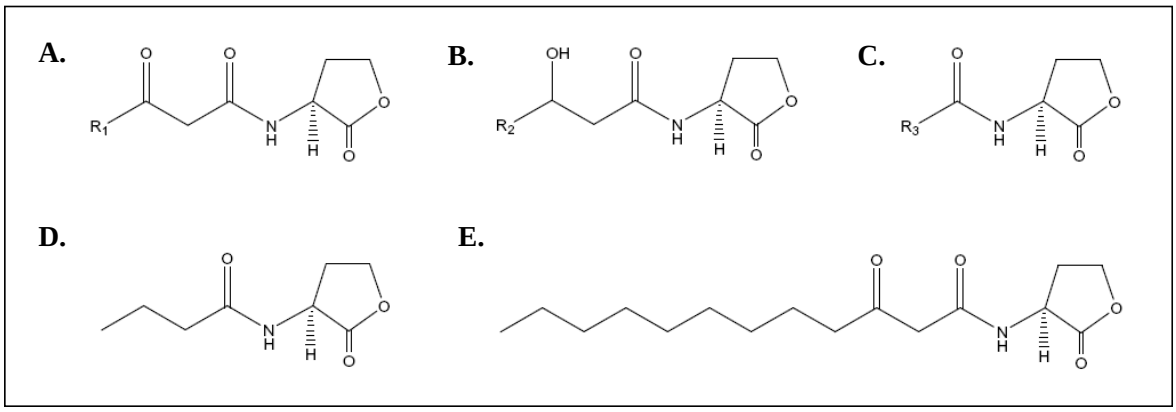


Abbildung A.4: Darstellung allgemeiner Strukturen der *N*-(Acyl)-L-Homoserinlactone Gram-negativer Bakterien mit einer **A.** Oxo- **B.** Hydroxy- und **C.** Keiner Substitution an Position C_3. Von *P. aeruginosa* produzierte AHL: **D.** Kurzkettiges *N*-(Butanoyl)-L-Homoserinlacton (C_4-HSL) und **E.** Langkettiges, Oxo-substituiertes *N*-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserinlacton (3oxoC_{12}-HSL).

AHL haben nicht nur die Funktion, eine dichteabhängige Expression von Virulenzfaktoren zu regulieren, sondern stellen selbst Virulenzfaktoren dar, indem sie immunmodulatorische Eigenschaften besitzen. Sie können sowohl das Immunsystem von höheren Pflanzen, als auch von Menschen und Tieren beeinflussen (Übersicht in Bauer, W. D. *et al.* 2004 und Cooley, M. *et al.* 2008). So wurde gezeigt, dass Tomatenpflanzen auf C_4- und C_6-HSL-Moleküle von Rhizosphärenbakterien reagieren, indem die Pflanze die Expression von Abwehrgenen im Spross gegen den pflanzenpathogenen Pilz Alternaria alternata induziert. Somit wird die systemische Resistenz der Tomatenpflanze durch die AHL-Moleküle der Bakterien aktiviert (Schuhegger, R. *et al.* 2006).

Telford *et al.* (1998) konnten demonstrieren, dass das langkettige 3oxoC_{12}-HSL, die Produktion einiger Zytokine von LPS-stimulierten Makrophagen reduziert und die Proliferation von Lymphozyten inhibiert. Des Weiteren war bei höheren Konzentrationen (> 70 µM) des Signalmoleküls die Synthese von spezifischen Antikörpern von Hämocyanin-stimulierten Milzzellen inhibiert, während sie bei niedrigeren Konzentrationen (< 70 µM) von 3oxoC_{12}-HSL aktiviert wurde. Bei IL-4-stimulierten peripheren mononuklearen Blutzellen (PBMZ) war die IgE Produktion unter Einfluss von 3oxoC_{12}-HSL (100 µM) erhöht (Telford, G. *et al.* 1998). Smith und Kollegen zeigten 2002, dass T-Zellen unter Einwirkung von 3oxoC_{12}-HSL das inflammatorische Zytokin IFN-gamma produzierten, welches die Th1-Antwort bzw. die Induktion einer Entzündungsreaktion begünstigt (Smith, R. S. *et al.* 2002a). Weiter wurde berichtet, dass 3oxoC_{12}-HSL die Apoptose in nicht-lymphoiden Leukozyten induziert und einen Einfluss auf die T-Zellantwort hat (Ritchie, A. J. *et al.* 2005). 3oxoC_{12}-HSL erhöht die

Apoptoserate von Makrophagen aus dem Knochenmark, von Neutrophilen und von Monozytenzelllinen, während dies unter Einwirkung von C_4-HSL nicht der Fall ist (Tateda, K. *et al.* 2003).

A.3. Das Immunsystem

A.3.1. Angeborenes Immunsystem

Das angeborene, unspezifische Immunsystem besteht aus phylogenetisch konservierten Abwehrmechanismen, die bei Pflanzen, Insekten und Säugetieren zu finden sind (Hoffmann, J. A. *et al.* 1999). Es bildet die erste Verteidigungslinie gegenüber Infektionen, welche innerhalb von Minuten aktiviert werden kann (Medzhitov, R. 2001). Die erste Barriere für eindringende Keime ist der Säureschutzmantel der Haut und die intakte Epidermis. Weitere Bestandteile des angeborenen Immunsystems sind die Moleküle des Komplementsystems, antimikrobielle Enzymsysteme wie Lektine und Defensine, sowie unspezifische Mediatoren wie Interferone und Interleukine. Monozyten, Makrophagen und Granulozyten, z.B. neutrophile Granulozyten (kurz: Neutrophile) sowie dendritische Zellen (DZ), nehmen eingedrungene Keime durch Phagozytose auf (Janeway, C. A. *et al.* 2009). Neutrophile spielen in der Pathogenese in der ZF-Lunge eine große Rolle. Sie werden durch Substanzen, die von *P. aeruginosa* sezerniert werden in die Apoptose getrieben. Dabei schüttet der neutrophile Phagozyt vermehrt Proteasen aus, die wiederum andere zu Hilfe eilende Neutrophile abtöten. Durch die sezernierten Proteasen entstehen Entzündungsreaktionen und das Lungengewebe wird hochgradig geschädigt (Sabroe, I. *et al.* 2007; Hartl, D. *et al.* 2007).

Zusätzlich sind die Mastzellen, welche für die Auslösung allergischer Reaktionen zuständig sind, und natürliche Killerzellen zu nennen. Beide spielen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von intrazellulären Keimen, wie z.B. Viren. Die Zellen des angeborenen Immunsystems spielen bei der Auslösung und der anschließenden Steuerung der adaptiven Immunreaktion eine entscheidende Rolle. Aus diesem Grund nehmen einige Zelltypen, wie z.B. die DZ, eine Zwischenstellung zwischen den beiden Immunsystemen ein (Janeway, C. A. *et al*. 2009). Auf die Monozyten und die DZ und ihre Eigenschaften, wird in Abschnitt A.3.3. und A.3.4. noch näher eingegangen.

A.3.2. Erworbenes Immunsystem

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem ist das adaptive Immunsystem darauf programmiert, körperfremde Moleküle spezifisch zu erkennen und zu entfernen. Die wichtigsten Elemente der spezifischen Abwehr sind T- und B-Lymphozyten. Diese sind mit charakteristischen Rezeptoren ausgestattet, deren antigenerkennende Abschnitte durch genetische Rekombination und enorme Diversität ausgezeichnet sind. Beide Zellen entstehen aus pluripotenten Stammzellen aus dem Knochenmark. Die Differenzierung und Vermehrung findet aber in zwei unterschiedlichen primären lymphatischen Organen statt.

Die T-Lymphozyten werden im Thymus selektioniert. Dort lernen sie, mittels klonaler Selektion, zwischen körperfremd und körpereigen zu unterscheiden. T-Lymphozyten sind für die antigenspezifische Immunität zuständig, welche auch als zelluläre Immunantwort bekannt ist. Solange sie noch keinen Antigenkontakt hatten, werden sie als naive Lymphozyten bezeichnet. Nach Erstkontakt mit dem Antigen werden sie aktiviert und eine klonale Expansion, eine Differenzierung zu Effektor- und Gedächtniszellen findet statt. Für die Auslösung einer Reaktion sind allerdings andere Zellen des angeborenen Immunsystems, wie z.B. die Monozyten, Makrophagen und DZ, notwendig. Mittels des T-Zellrezeptors (TZR) erkennen T-Lymphozyten spezifische Peptidantigene, welche auf den Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC I und MHC II) präsentiert werden. MHC I ist auf der Oberflächenmembran jeder kernhaltigen Zelle zu finden, während MHC II auf der Oberfläche von professionell antigenpräsentierenden Zellen (APZ) zu finden ist. Zu den APZ gehören die B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und DZ. Von den T-Lymphozyten existieren verschiedene Subpopulationen. Die zwei wichtigsten Subtypen sind die zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen (Tc-Zellen), welche ihre Zielzellen lysieren oder deren Apoptose einleiten und die T-Helfer-Zellen (Th-Zellen), welche $CD4^+$ positiv sind und über die Produktion von Signalstoffen die Immunfunktion modulieren. Tc-Zellen interagieren mit MHC Klasse I, welche endogenes Antigen präsentieren; Th-Zellen erkennen das MHC Klasse II-Molekül, welches exogene Fremdproteine aufnimmt, prozessiert und präsentiert.

Die Entwicklung der B-Lymphozyten erfolgt im Knochenmark. Ihre Aufgabe besteht darin, körperfremde Antigene zu erkennen und Antikörper, so genannte „Immunglobuline“

(Ig), mit variabler Struktur zu produzieren. Bislang sind 5 Klassen von Immunglobulinen beschrieben worden: IgG, IgM, IgA, IgD und IgE. Die Art der B-Zellinduzierten Immunabwehr wird auch als humorale Immunantwort bezeichnet (Janeway, C. A. *et al.* 2009).

A.3.3. Monozyten

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Monozyten und DZ gearbeitet, deshalb wird hier auf diese Zellen im Besonderen eingegangen.
Monozyten machen 5-10% der Leukozytenpopulation aus und haben einen länglichen, meist nierenförmigen Kern. Sie entwickeln sich im Knochenmark aus hämatopoetischen Vorläuferzellen (Übersicht in Seta, N. *et al.* 2007). Ausgereifte Monozyten verlassen das Knochenmark und zirkulieren mehrere Tage im Blutkreislauf. Abhängig vom Zielgewebe differenzieren sie sich in gewebespezifische Makrophagen, die für Monate bzw. Jahre persistieren können. Im Immunsystem nimmt das Monozyten/Makrophagen-System eine Schlüsselrolle bei der Phagozytose, der Antigenpräsentation, der Bekämpfung von Keimen, sowie bei der Produktion von Entzündungsmediatoren (Zytokine und Interleukine) ein. Auf der Zelloberfläche von Monozyten befindet sich eine Vielzahl an Rezeptoren, z.B. CD14, welches einen Lipopolysaccharidrezeptor darstellt und spezifisch für diese Leukozytenpopulation ist (Janeway, C. A. *et al.* 2009).

A.3.4. Dendritische Zellen

DZ haben ihren Namen aufgrund ihrer lang gestreckten, zytoplasmatischen Fortsätze (Steinman, R. M. *et al.* 1973). Sie spielen eine zentrale Rolle im angeborenen und erworbenen Immunsystem, weil sie eine Schnittstelle zwischen den beiden Systemen bilden und hochspezialisierte, effektive antigenpräsentierende Zellen sind, welche die T-Zellantwort aktivieren und polarisieren. Die DZ zirkulieren im Blut und in der Lymphe und gelangen somit in periphere Gewebe bzw. in sekundäre lymphoide Organe, wo sie primär lokalisiert sind. Die hämatopoetischen DZ-Stammzellen sitzen im Knochenmark, wo sie $CD34^+$ Vorläuferzellen bilden (Shortman, K. *et al.* 2002), welche über das Blut in

periphere Gewebe wandern. Die DZ stellen eine sehr heterogene Zellpopulation dar, die sich aufgrund ihrer Expression von Oberflächenmarkern unterscheiden lässt. Es gibt $CD11c^+/CD1b^+$ myeloide und $CD123^+$ plasmazytoide Populationen (MacDonald, K. P. *et al.* 2002). Die plasmazytoiden DZ exprimieren weniger MHC Klasse I-Moleküle und haben ihre Hauptaufgabe in der Bekämpfung von Viren (Barchet, W. *et al.* 2005; Übersicht in de Jong, E. C. *et al.* 2005). Die Gruppe der myeloiden DZ entsteht *in vitro* aus drei verschiedenen Zellen nach Stimulation und Aktivierung; dazu gehören die dermalen oder interstitiellen DZ, die peripheren Monozyten im Blut und die Langerhans-Zellen der Epidermis. Diese Zellen sind aus $CD14^+$ Vorläuferzellen entstanden. Die plasmazytoiden DZ werden aus plasmazytoiden Vorläuferzellen nach Aktivierung gebildet.
Eine Generierung von humanen oder murinen myeloiden DZ *in vitro* kann durch die Isolierung und Kultivierung von peripheren Blutmonozyten unter Einfluss des Granulozyten/Makrophagen-kostimulierenden Faktors (GM-CSF) (Inaba, K. *et al.* 1992) und Interleukin-4 (IL-4) erfolgen, da es schwierig ist, humane DZ *ex vivo* in ausreichender Menge zu isolieren.

A.3.4.1. Antigenpräsentation

Im peripheren Gewebe lokalisierte DZ sind zunächst wenig aktiv. Die Stimulation erfolgt nach Aufnahme von endo- oder exogenem Material (u.a. Bakterien, Viren, Parasiten, Protisten, apoptotische und nekrotische Zellfragmente) (Reis e Sousa, C. *et al.* 1999) mittels Phagozytose, Makro- oder Mikropinozytose (Sallusto, F. *et al.* 1995) oder rezeptorvermittelter Endozytose über C-Typ Lektine (Übersicht in Kerrigan, A. M. *et al.* 2009). Zusätzlich können die DZ Immunglobulinkomplexe und opsonierte Partikel an ihre Fc-gamma Rezeptoren CD64 (Typ I) und CD32 (Typ II) binden (Fanger, N. A. *et al.* 1996). Ein weiterer Mechanismus der Antigenerkennung erfolgt über so genannte „Toll-like-Rezeptoren“ (TLR). Diese transmembranen Rezeptoren identifizieren hochkonservierte, pathogene Strukturen (Takeda, K. *et al.* 2003). Wichtige Beispiele sind TLR2, welche Lipoproteine und Lipoteichonsäuren von Gram-positiven Bakterien erkennen (Hertz, C. J. *et al.* 2001), TLR4, welche das Lipopolysaccharid von Gram-negativen Bakterien binden (Qureshi, S. T. *et al.* 1999), TLR7, welche virale Erreger

identifizieren und TLR9, welche nicht-methylierte DNA-Sequenzen mit einem CG-Dinukleotid im Zentrum wahrnehmen können (Ito, T. *et al.* 2002; Takeda, K. *et al.* 2003).

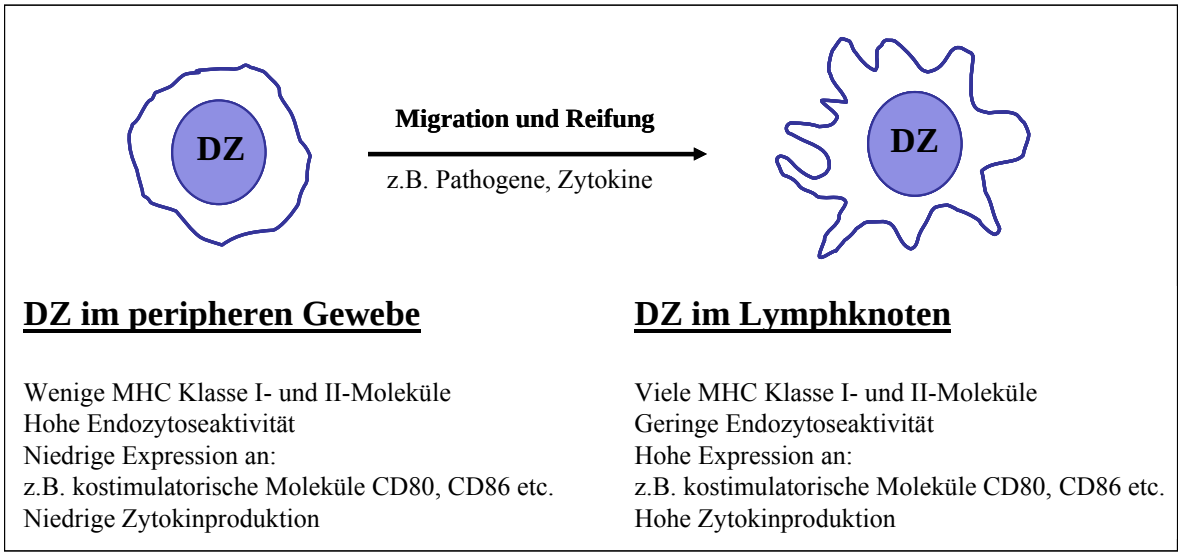


Abbildung A.5: Änderungen der funktionellen Eigenschaften einer DZ

Jarrossay *et al.* (2001) konnte zeigen, dass die DZ, welche aus dem humanen Blut generiert wurden, neben anderen Rezeptoren, auch TLR4 exprimieren, jedoch nicht TLR7 und TLR9. Im Gegensatz dazu exprimieren plasmazytoide DZ fast ausschließlich TLR7 und TLR9 (Jarrossay, D. *et al.* 2001).

Das Antigen wird nach Aufnahme degradiert, prozessiert und in MHC Klasse I- oder II-Moleküle geladen (Cella, M. *et al.* 1997; Übersicht in Banchereau, J. *et al.* 1998; Inaba, K. *et al.* 2000). Die so aktivierten DZ migrieren entlang eines Chemokin-Gradienten innerhalb der lymphatischen Gefäße zu den drainierenden lymphoiden Organen. Während dieser Wanderung verändern sie ihre funktionellen Eigenschaften, wobei sich ihre Morphologie entsprechend verändert (Abbildung A.5). Unter anderem exprimieren sie erhöht die Moleküle CD83, CD80, CD86, ICAM-1 (CD54) und MHC Klasse I+II (Sallusto, F. *et al.* 1994; Romani, N. *et al.* 1996; Lechmann, M. *et al.* 2002; Rossi, M. *et al.* 2005) und verlieren ihre Phago- bzw. Pinozytosefähigkeit (Übersicht in Thery, C. *et al.* 2001 und Jarrossay, D. *et al.* 2001). Im Lymphknoten angekommen aktivieren sie naive T-Zellen und initiieren somit die Immunantwort.

A.3.4.2. Aktivierung und Polarisierung von T-Zellen

Nach der Migration in die regionären Lymphknoten sind die gereiften DZ für die klonale Proliferation und die Differenzierung der naiven T-Lymphozyten maßgebend (so genanntes „T-Zellpriming“) (Steinman, R. M. *et al.* 1999). Die Polarisierung der T-Zellen wird durch drei Signale bestimmt, welche von den reifen DZ ausgehen (Abbildung A.6). DZ präsentieren den T-Zellen spezifische antigene Strukturen auf MHC I oder II, welche diese mit Hilfe ihrer T-Zellrezeptoren erkennen. Dieses Zusammenspiel zwischen DZ und T-Zelle stellt das erste Signal der T-Zellaktivierung dar. Das zweite Signal entsteht durch die Interaktion der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 der DZ mit CD28, welches konstitutiv auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert wird. Dies induziert die Produktion immunmodulatorischer Zytokine z.B. IL-12, IL-4, IL-10 (Signal 3) (Kalinski, P. *et al.* 1999). Durch die Aktivierung der T-Zellen wird auf ihrer Oberfläche ein weiteres Molekül induziert, welches als CD40 Ligand (CD40L) bezeichnet wird. Durch Interaktion mit CD40 auf der Oberfläche der DZ nimmt die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 weiter zu (Übersicht in Kapsenberg, M. L. 2003). Abhängig von der Zusammensetzung der drei Signalkomponenten entwickeln sich verschiedene Subpopulationen der Effektorzellen, die der jeweiligen klinischen Situation angepasst sind. Für die Differenzierung von naiven T-Zellen in $CD4^+$ Th1-Effektorzellen ist eine Sekretion des heterodimeren Zytokins IL-12(p70), welches aus den Untereinheiten p35 und p40 besteht, notwendig (Heufler, C. *et al.* 1996; Übersicht in Trinchieri, G. *et al.* 2003). Für die Polarisation in Richtung $CD4^+$ Th2-Zellen ist IL-4 essentiell, während die Entwicklung der regulatorischen T-Zellen (Treg) durch IL-2, IL-10 und TGF-beta gesteuert wird (Übersicht in de Jong, E. C. *et al.* 2005 und Smits, H. H. *et al.* 2005). $CD8^+$ T-Zellen differenzieren sich in zytotoxische T-Zellen (Tc1 und Tc2) und eliminieren infizierte oder entartete humane Zellen. IFN-gamma und IL-4 induziert die Differenzierung naiver $CD8^+$ T-Zellen in Tc1 und Tc2. IL-12 unterstützt zusätzlich die Entwicklung der Tc1-Zellen. Tc1-Zellen produzieren nach der Differenzierung IFN-gamma, während Tc2-Zellen IL-4 synthetisieren (Vukmanovic-Stejic, M. *et al.* 2000).

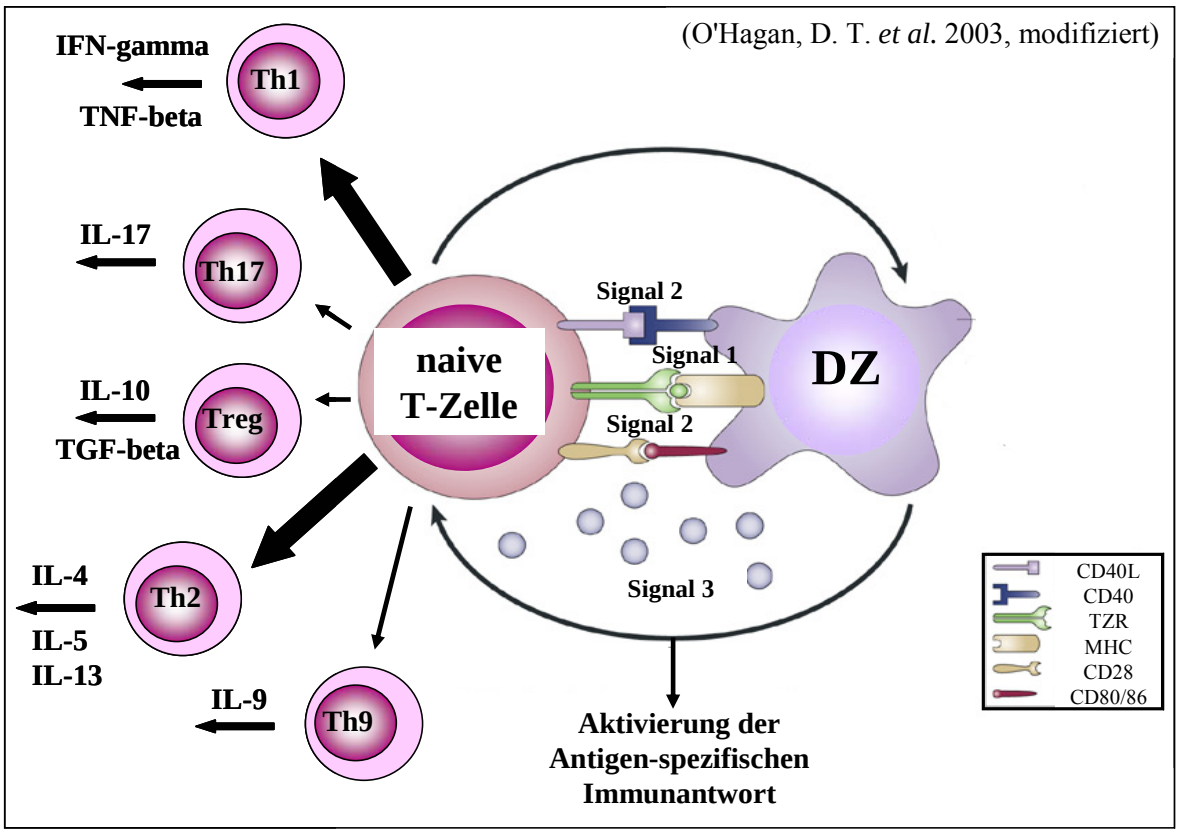


Abbildung A.6: Interaktion einer naiven T-Zelle mit einer DZ und die daraus resultierende Aktivierung und Polarisierung der spezifischen T-Zellantwort (O'Hagan, D. T. *et al.* 2003, modifiziert). **Signal 1:** Antigenspezifische Bindung (TZR) nach Antigenpräsentation (MHC). **Signal 2:** Interaktion von CD28 (T-Zelle) mit den kostimulatorischen Molekülen CD80/CD86 (DZ) und CD40L (T-Zelle) mit CD40 (DZ). **Signal 3:** Produktion von löslichen Faktoren (Zytokine und Chemokine).

Th1-Immunantworten dominieren vor allem bei klassischen inflammatorischen Prozessen oder viralen Infektionen. Typische Zytokine, welche von Th1-Zellen produziert werden, sind IFN-gamma, IL-2 und TNF-alpha und -beta. IL-4, IL-5 und IL-13 Zytokine werden bei Th2-Immunantworten hauptsächlich im Rahmen von Allergien und Parasiteninfektionen sezerniert. Die Th1- und Th2-Reaktionen beeinflussen sich gegenseitig: IL-4 hemmt die Bildung von Makrophagen, während IFN-gamma die IgE-Produktion hemmt (Übersicht in Abbas, A. K. *et al.* 1996; Farrar, J. D. *et al.* 2002 und de Jong, E. C. *et al.* 2005).

A.4. Ziele dieser Arbeit

Das Quorum sensing Molekül 3oxoC_{12}-HSL des bakteriellen Pathogens *P. aeruginosa* besitzt immunmodulatorische Eigenschaften. Dies wurde bisher in verschiedenen humanen und murinen Zellen nachgewiesen. Da die DZ eine zentrale Schaltstelle des Immunsystems darstellen, weil sie mit Mikroorganismen und deren sekretierten Substanzen interagieren und als potente antigenpräsentierende Zelle somit die erworbene Immunantwort induzieren, könnten sie der Schlüssel zum Verständnis der Wirkungsweise von 3oxoC_{12}-HSL in der Lunge von ZF-PatientInnen sein. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass *P. aeruginosa* mittels 3oxoC_{12}-HSL Funktionen von DZ inhibiert, um die Reaktion des Immunsystems zu schwächen. In der vorliegenden Arbeit sollten diesbezüglich aus Monozyten generierte humane DZ, welche durch Stimulation mit Jonuleit Cocktail (JC) bzw. LPS gereift sind, als Modell dienen, um den Einfluss von 3oxoC_{12}-HSL auf die Expression von Oberflächenstrukturen, auf das Zytokinsyntheseprofil, auf das Migrations- und Phagozytoseverhalten und auf die T-zellstimulierenden Eigenschaften zu testen.

B. MATERIAL UND METHODEN

TEIL: MIKROBIOLOGIE

B.1. Kultivierung von Mikroorganismen

B.1.1. Verwendete Mikroorganismen

Tabelle B.1: Verwendete Mikroorganismen

Organismus	**Referenz**
Pseudomonas spec. DSMZ 13134	Sourcon-Padena GmbH & Co. KG, Tübingen, Deutschland
Pseudomonas spec. DSMZ 13134 Plasmid pJBA28, GFP-markiert	Dr. Uta von Rad, Institut für biochemische Pflanzenpathologie, Helmholtz Zentrum München, Deutschland
Pseudomonas aeruginosa P1E (Klinikisolat eines zystische Fibrose Patienten)	Prof. Dr. Matthias Griese, Dr. von Haunersches Kinderspital, München, Deutschland 16S-rDNA wurde sequenziert von Dr. Michael Rothballer, Abteilung Mikroben-Pflanzen Interaktion, Helmholtz Zentrum München
Pseudomonas putida F117 Plasmid pKR-C12, GFP-markiert	Abteilung Mikroben-Pflanzen Interaktion, Helmholtz Zentrum München

B.1.2. Herstellung von Medien und Puffern

Die verwendeten Chemikalien zur Anzucht von Bakterien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in p.a. Qualität von den Firmen Sigma (Taufkirchen, Deutschland), VWR (Ismaning, Deutschland) und Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Für die Herstellung aller Nährmedien wurde einfach entionisiertes Wasser ($H_2O_{dem.}$) verwendet. Hitzestabile Lösungen wie Medien wurden mit einem Wasserdampf-Hochdruckautoklaven (Systec D65 und Systec V65, Systec GmbH Labor-Systemtechnik, Wettenberg, Deutschland) für 20 min bei 121°C und $1{,}013 \times 10^5$ Pa Überdruck sterilisiert. Die pH-Werte wurden, soweit nicht anders angegeben, mit NaOH bzw. HCl entsprechender Normalität eingestellt (pH-Meter, pH 523, WTW, Weilheim, Deutschland).

B.1.3. Kultivierungsmedien

Falls nicht anders angegeben wurde zur Herstellung von Festmedien pro Liter Flüssigkeit 15 g Agar (Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben und im selben Gefäß autoklaviert.

LB (Luria-Bertani)-Medium	Caseinhydrolysat	10 g
(nach Bertani, G. 1951, modifiziert)	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	4-5 g
	ad $H_2O_{dem.}$	1000 ml
	pH 7,4	
LB Broth	Fertigmedium	20 g
(Luria-Bertani)	ad $H_2O_{dem.}$	1000 ml

LB AGAR	Fertigmedium	35 g
(Lennox L Agar)	ad $H_2O_{dem.}$	1000 ml

King´s B Medium	Proteose-Peptone	20 g
(King, E. O. *et al.* 1954)	Glycerol	10 ml
	K_2HPO_4	1,5 g
	$MgSO_4$ x 7 H_2O	1,5 g
	ad $H_2O_{dem.}$	1000 ml
	pH 7,2	

B.1.4. Antibiotika

Zur Kultivierung plasmidhaltiger Bakterienstämme wurden den Selektivmedien Antibiotika in den entsprechenden Konzentrationen (Tabelle B.2) zugesetzt. Das GFP-markierte Bakterium *Pseudomonas* spec. DSMZ 13134 (Tabelle B.1) wurde in King´s B Medium mit Kanamycin als Selektionsdruck für das Plasmid pJBA28 inkubiert. *Pseudomonas putida* F117 wurde in LB-Medium mit Gentamycin-Zusatz (Plasmid pKR-C12) kultiviert. Die Antibiotika wurden in H_2O_{reinst} aus der Reinstwasseranlage (Milli-Q PLUS, Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland) gelöst. Die 1000-fach konzentrierte Stammlösung wurde steril filtriert (Sterilfilter 0,22 Porengröße, Millipore GmbH) und bei -20°C gelagert. Antibiotika wurden den Flüssigmedien direkt vor Inokulation mit den Bakterien zugesetzt. Festen Nährmedien wurde das Antibiotikum nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf etwa 45°C zugegeben. Mit Antibiotikum versehene Festmedien wurden maximal für 2 Monate bei +4°C gelagert.

Tabelle B.2: Verwendete Antibiotika

Medien-zusatz	**Wirkmechanismus**	**Lösungs-mittel**	**Arbeits-konzentration**
Kanamycin	Aminoglycosid, hemmt die Proteinbiosynthese durch Bindung an die 30S Untereinheit der Ribosomen	H_2O_{reinst}	50 µg/ml
Gentamycin	Aminoglycosid, hemmt die Proteinbiosynthese durch Bindung an die 30S Untereinheit der Ribosomen	H_2O_{reinst}	40 µg/ml

B.1.5. Anzucht der Mikroorganismen und Stammhaltung

Die Inokulation von Flüssigmedien der aerob wachsenden Pseudomonaden-Stämme (Tabelle B.1) erfolgte über eine Glycerinkultur oder ausgehend von einer Einzelkultur auf Platte. Die Inkubation fand in Reagenzgläsern, aerob mit Belüftung, in einer definierten Menge King´s B- oder LB-Flüssigmedium mit und ohne Antibiotikum-Zusatz (Abschnitt B.1.3. und B.1.4.) ÜN auf Rundschüttlern bei 180 rpm (Excella E24, New Brunswick, Scientific, Edison, NJ, USA), bei 27°C bzw. 37°C, statt. Die Anzucht auf Festmedien erfolgte ebenfalls aerob im Brutschrank (Typ B6, Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland). Agarplatten wurden ebenfalls nach der Inkubation im Kühlschrank gelagert.
Für die längerfristige Haltung der Stämme wurden von allen verwendeten Bakterienstämmen Glycerinkulturen hergestellt. Die Pseudomonaden wurden ausgehend von einer Einzelkolonie auf Platte in Flüssigmedium kultiviert. Nach Zentrifugation bei 4260 x g für 7 min (Rotana 460R, Hettich Zentrifuge, Bäch, Schweiz) wurden die Stämme in einer 1x PBS Glycerin-Lösung aufgenommen. Von den Bakteriensuspensionen wurde jeweils 1 ml in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80°C gelagert. Durch Glycerin kann eine Schädigung der Zellen während des Einfrierprozesses weitgehend verhindert werden. Die Reinheit der Kulturen wurde durch erneutes Ausstreichen auf Festmedium und mikroskopisch mit einem Öl-Immersionsobjektiv (Axioskop, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) überprüft. Diese Glycerinkulturen waren auch nach mehreren Jahren noch rekultivierbar. Zur Wiederanzucht der Stämme wurden die bei -80°C gelagerten

Glycerinkulturen teilweise aufgetaut und ein entsprechendes Volumen mit einer sterilen Pipette oder einer sterilen Impföse entnommen, um damit die Flüssigkulturen oder festen Nährböden anzuimpfen.

B.1.6. Keimzahlbestimmung von Bakterien

Unter der so genannten „Keimzahl" versteht man die Anzahl an koloniebildenden Einheiten (CFU) einer bestimmten Spezies, die in einem Milliliter Kultur unter definierten Bedingungen und auf einem bestimmten Nährmedium ermittelt wird.
Zur Keimzahlbestimmung von *P. aeruginosa* P1E wurde der Stamm ausgehend von einer Glycerinkultur (Abschnitt B.1.5.) ÜN kultiviert, danach zweimal mit 10 ml D-PBS gewaschen. Nach der Resuspension des Pellets in D-PBS wurde die optische Dichte bei 436 nm ermittelt. Zudem wurde eine Verdünnungsreihe in Triplikaten angelegt, indem 100 µl Zellsuspension der jeweiligen Verdünnung auf LB-Agarplatten ausgestrichen und aerob bei 37°C für 48 h inkubiert wurden. Nach 2-facher Wiederholung der Bestimmung wurden zur nochmaligen Verifikation der ermittelten CFU mikroskopische Zählungen durchgeführt.
Die Zellzahl des Proradix®-Stammes (*Pseudomonas* spec. DSMZ 13134) wurde von Dr. Katharina Buddrus-Schiemann (AMP, Helmholtz Zentrum München) ebenfalls durch Plattenkoloniezählung bestimmt und das Ergebnis übernommen.

B.1.7. Kultivierung der Bakterien für den Phagozytosetest

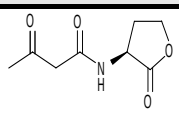
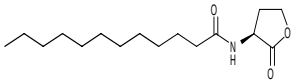
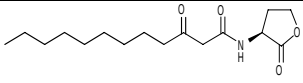
5 ml LB-Medium oder King´s B Medium mit und ohne Kanamycin-Zusatz (Abschnitt B.1.4.) wurden mit einer definierten Menge einer Glycerinkultur der verwendeten Pseudomonaden-Stämme (Tabelle B.1) angeimpft und ÜN bei 27°C oder 37°C auf dem Rundschüttler bei 180 rpm inkubiert. Nach der Ernte (Rotana 460R bei 4500 x g, 7 min, 21°C) wurde das Pellet in 20% Serum von ZF-PatientInnen und D-PBS resuspendiert und für die Prä-Opsonierung mit im Serum enthaltenen unkonjugierten Antikörpern im Brutschrank bei 37°C für ca. 2 h inkubiert. Anschließend wurde mit 10 ml D-PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 1 ml FACS-Puffer (I.) resuspendiert. Die nicht

GFP-markierten Pseudomonaden-Stämme wurden unter Zugabe von 20 µl eines FITC-konjugierten sekundären Anti-Human-IgG, IgM, IgA Antikörpers (Tabelle B.9) für 30 min im Dunkeln bei RT gefärbt. Die Zellzahlbestimmung erfolgte nach einem weiteren Waschschritt (s.o.) über die Messung der optischen Dichte und den dazu in früheren Experimenten festgelegten korrelierenden Zellzahlen.

B.2. Synthetische AHL

Die in dieser Arbeit verwendeten synthetischen AHL-Moleküle wurden von der University of Nottingham (School of Molecular Medical Sciences, Centre for Biomolecular Science, Nottingham England) bezogen und sind in der Tabelle B.3 aufgelistet.

Tabelle B.3: Synthetische *N*-(Acyl)-L-Homoserinlactone

***N*-(Acyl)-L-Homoserinlacton**	**Abkürzung**	**Summen-formel**	**Molekül-masse**	**Strukturformel**
N-(3-Oxobutyryl)-L-Homoserinlacton	3oxoC_4-HSL	$C_8H_{11}NO_4$	185	
N-(Dodecanoyl)-L-Homoserinlacton	C_{12}-HSL	$C_{16}H_{29}NO_3$	283	
N-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserinlacton	3oxoC_{12}-HSL	$C_{16}H_{27}NO_4$	297	

B.2.1. Herstellung und Lagerung der AHL-Aliquots

Aus dem lyophilisierten AHL-Pulver wurde eine 0,1 M Lösung mit DMSO hergestellt. Davon wurden 10 µl in Glasröhrchen aliquotiert. Da die AHL in gelöster Form sehr schnell zerfallen erfolgte eine anschließende Abdampfung des Lösungsmittel im N_2-Strom unter Benutzung eines Evaporators (Typ 2363-DA, Geb. Liebisch, Bielefeld, Deutschland). Der Evaporator besteht aus einer Begasungseinheit kombiniert mit einem Metallblockthermostat. Während des Abdampfprozesses wurde allerdings nicht geheizt, um die AHL nicht zu zerstören. Das trockene AHL-Pulver wurde bei -20°C gelagert. Vor Gebrauch wurden 15 µl DMSO pro Aliquot zugegeben. Die gelösten AHL wurden dann maximal 2 Wochen im Kühlschrank bei +4°C gelagert.

B.2.2. Durchführung von AHL-Biotests

Um die Bioaktivität der abgedampften, aliquotierten AHL sicherzustellen, wurden Biotests durchgeführt. Dafür wurde der Reporterstamm *Pseudomonas putida* F117 (Steidle, A. *et al.* 2002) verwendet, eine AHL-Negativmutante von *P. putida* IsoF, welche ein GFP-markiertes pKR-C12 Sensorkonstrukt enthält (Tabelle B.1) (Riedel, K. *et al.* 2001). Dieses ist spezifisch für AHL mit langen Seitenketten ohne und mit Oxo-Substitution. Für die Tests wurde *P. putida* F117 in LB-Medium mit Gentamycin-Zusatz (Tabelle B.2) ÜN inkubiert und auf selektives Festmedium plattiert. Nach dem Auflösen der AHL in DMSO wurden 10 µl in den Konzentrationen 1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml auf die Platte aufgetragen und ÜN bei 37°C im Brutschrank (Innova 4200, New Brunswick, Scientific, Edison, NJ, USA und Memmert GmbH und Co. KG, Schwabach, Deutschland) inkubiert. Danach wurde nochmals für die Reifung des GFP-Proteins für 24 h bei +4°C inkubiert. Die Auswertung wurde mit einem Stereomikroskop (Abschnitt B.11.4.) vorgenommen, mit welchem GFP-Fluoreszenz detektiert werden kann. Eine Fluoreszenz ist bei diesem Verfahren nur dann sichtbar, wenn das zu testende AHL intakt ist.

TEIL: ZELLKULTUR

B.3. Kultivierung von humanen Zellen

Periphere mononukleare Blutzellen wurden aus frischem, venösem Vollblut von gesunden Spendern isoliert. PBMZ sind ein Gemisch aus Monozyten und Lymphozyten. Mit den Monozyten wurden Versuche durchgeführt oder aus diesen, unter Verwendung von Zytokinen, DZ generiert. Für T-Zellstudien wurden zytotoxische T-Zellklone (JB4-ZTL), eine Melanomzelllinie (Mel 93.04 A12.1), eine B-lymphoblastoide Zelllinie (B-LCL LAZ 388), eine Nierenzellkarzinomlinie (RCC-26) und PBL-Pools (Periphere Blutlymphozyten) verwendet. Alle Zellen wurden im Brutschrank (HeraCell240 und Heraeus BDD 6220, Thermo Fisher Scientific, Hanau, Deutschland) bei 37°C in einer wassergesättigten 5%igen CO_2 Atmosphäre inkubiert. Bei der Handhabung der humanen Zellen wurde streng auf Sterilität geachtet. Alle verwendeten Lösungen und Medien wurden vor Benutzung in einem thermostatischen Wasserbad auf 37°C erwärmt.

B.3.1. Verwendete Zellen

JB4-ZTL: Auf HLA-A2 beschränkter, zytotoxischer T-Zellklon, der das HLA-A2 Molekül als Alloantigen erkennt. Herkunft ist das Institut für molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München.

Mel 93.04 A12.1: Adhärent wachsende Melanomzelllinie (Kontrollzellen), die auf HLA-A*0201 das Melan-A/MART-1 Peptid präsentiert und mit dem IL2-Gen transfiziert ist. Herkunft von P. Schrier, Leiden, Niederlande.

RCC-26: Adhärent wachsende Nierenzellkarzinomlinie, die als Restimulations- und Kontrollzellen gebraucht wurden. Herkunft ist das Institut für molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München.

B-LCL LAZ 388: EBV-transformierte B-Zelllinie (so genannte „Feederzellen“). Herkunft von A. Mackenson, Freiburg, Deutschland.

PBL-Pool: Periphere Blutlymphozyten (Feederzellen) isoliert aus venösem Vollblut von 3-5 gesunden Spendern.

PBMZ: Isoliert aus venösem Vollblut von gesunden Spendern.

B.3.2. Kultivierungsmedien

RPMI 1640 Medium (1x) mit stabilem Glutamin & 2,0 g/l $NaHCO_3$ pH 6,9 -7,5	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
RPMI 1640 Medium (1x) ohne Glutamin	GIBCO® Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
AIM V® Medium ohne L-Glutamin	GIBCO® Invitrogen

B.3.3. Seren

Die in der Arbeit verwendeten Seren wurden vor Verwendung steril filtriert (Sterilfilter 0,22 Porengröße, Millipore GmbH) und im Wasserbad bei 56°C für ca. 45 min hitzeinaktiviert.

Seren von ZF-PatientInnen	Prof. Dr. Matthias Griese, Dr. von Haunersches Kinderspital der LMU
Humanes AB Serum	CELLect®, MP Biomedicals™, Eschwege, Deutschland

Humanserum	Serumgemisch aus Spendern, Institut für molekulare Immunologie, Arbeitsgruppe Tumorimmunologie, Helmholtz Zentrum München
Fötales Kälberserum (FCS)	GIBCO® Invitrogen

B.3.4. Lösungen und Reagenzien

Biocoll-Trennlösung enthält Ficoll® 400, Dichte 1,077 g/ml	Biochrom AG
D-PBS Dulbecco´s Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (ohne Calcium & Magnesium)	GIBCO® Invitrogen
PBS-Trockensubstanz (ohne Calcium & Magnesium)	Biochrom AG
GlutaMAX™ -I Supplement, 200mM mit L-Alanyl-L-Glutamin in 0,85% NaCl	GIBCO® Invitrogen
L-Glutamin	GIBCO® Invitrogen
MEM-NEAA (nicht essentielle Aminosäuren)	GIBCO® Invitrogen
Natriumpyruvat	GIBCO® Invitrogen
Natriumazid	Sigma
Na_2CO_3	Sigma
Na_2HCO_3	Sigma

DMSO	Sigma
Trypsin/EDTA in PBS	GIBCO® Invitrogen
EDTA	Merck
Tween20	Sigma
Phosphorsäure	Sigma
Magermilchpulver	Merck
Entellan® Neu	Merck
Heparin-Natrium Braun 25000 I.E./5 ml	Braun, Melsungen, Deutschland
Trypanblau 0,4%	GIBCO® Invitrogen
Propidiumjodid	Sigma

B.3.5. Herstellung von Medien und Puffern

DZ-Medium

RPMI mit Glutamin, 5% Humanes AB Serum, 1% GlutaMAX

DZ-Medium mit Zytokinen

RPMI mit Glutamin, 5% Humanes AB Serum, 1% GlutaMAX, 20 ng/ml rhuIL-4, 100 ng/ml GM-CSF

RPMI (III.)

RPMI ohne Glutamin, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 1x MEM-NEAA

RCC-Medium (für RCC-26 und Mel 93.04 A12.1)

RPMI (III.), 12% FCS

T-Zellklon-Medium (für JB4-ZTL)

RPMI (III.), 7,5% FCS, 7,5% Humanserum, 500 U/ml rhuIL-2

B-LCL-Medium (B-LCL LAZ 388 Zellen)

RPMI (III.), 10% FCS

I. FACS-Puffer

D-PBS + 2% FCS

II. FACS-Puffer

D-PBS, 0,1% Natriumazid, 2% Humanserum, 2 mM EDTA

Coating-Puffer (ELISA)

8,4 g Na_2HCO_3, 3,6 g Na_2CO_3, ad $H_2O_{dem.}$ 1000 ml, pH 9,5

Waschpuffer (ELISA)

PBS, 0,05% Tween20

Blockierungspuffer (ELISA)

PBS, 1% Milchpulver

B.3.6. Lösungen für das Durchflusszytometer

BD FACSFlow™ Sheath Fluid	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD FACS™ Clean Solution	BD Biosciences
BD FACS™ Shutdown Solution	BD Biosciences

B.3.7. Kulturgefäße

12-well Platte, Nunclon™ Oberfläche	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
24-well Platte, Transwell® Polycarbonate Membrane, Porengröße 5.0 µm, 6.5mm Einsatz	Transwell® Permeable Supports, Costar®, Bodenheim, Deutschland
96-well Platte	TPP®, Trasadingen, Schweiz
96-well Platte, MaxiSorp™ Oberfläche	Nunc
Zellkulturflasche, Nunclon Oberfläche, 175 cm^2	Nunc
Zellkulturflasche, 75 cm^2	CELLSTAR®, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

B.3.8. Verwendete Stimulanzien

B.3.8.1. Zytokine

Tabelle B.4: Verwendete Zytokine

Stimulanz	**eingesetzte Konzentration**	**Lösungsmittel**	**Firma**
rhuIL-4	20 ng/ml	D-PBS + 2% Humanes AB Serum	CellGenix, Freiburg, Deutschland
rhuIL-2	50 U/ml	RPMI + 1% Humanserum	Proleukin, Chiron Biopharmaceuticals, München, Deutschland
GM-CSF Leukine Liquid (Sargramostin)	100 ng/ml	DZ-Medium	CellGenix

B.3.8.2. Lipopolysaccharid

Tabelle B.5: Verwendetes Lipopolysaccharid zur Reifung der DZ

Stimulanz	**eingesetzte Konzentration**	**Lösungsmittel**	**Firma**
LPS (*E. coli* 0111:B4)	0,1 µg/ml	DZ-Medium	Sigma

B.3.8.3. Jonuleit Cocktail

Tabelle B.6: Zusammensetzung des definierten Jonuleit Cocktails zur Reifung der DZ

Jonuleit Cocktail	**eingesetzte Konzentration**	**Lösungsmittel**	**Firma**
rhuTNF-α	10 ng/ml	100 µl steriles $H_2O_{dem.}$ + 900 µl D-PBS	PromoCell GmbH**,** Heidelberg, Deutschland
rhuIL-1ß	10 ng/ml	D-PBS	PromoCell GmbH
rhuIL-6 (*E. coli*)	15 ng/ml	D-PBS + 0,1% Humanes AB Serum	R&D System, Minneapolis, MN, USA
PGE_2	1000 ng/ml	DMSO + RPMI-Medium	Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA

B.3.8.4. Chemokine

Tabelle B.7: Verwendetes Chemokin zur Migration der DZ

Chemokin	**eingesetzte Konzentration**	**Lösungsmittel**	**Firma**
rhuCXCL12/SDF-*1*ß	100 ng/ml	D-PBS + 0,1% Humanes AB Serum	R&D System

B.3.9. Verwendete Antikörper

B.3.9.1. Primäre Antikörper

Tabelle B.8: Verwendete primäre Antikörper

Spezifität	Markierung	Klon	Spezies	Isotyp	Verdünnung*	Bezugsquelle
CD83	FITC	HB15e	Maus	IgG_1, κ	1:35	BD Biosciences
CD86 (B70/B7-2)	FITC	2331 (FUN-1)	Maus	IgG_1, κ	1:35	BD Biosciences
CD80 (B7-1)	PE	L307.4	Maus	IgG_1, κ	1:35	BD Biosciences
CD1a	PE	HI149	Maus	IgG_1, κ	1:35	BD Biosciences
CD14	APC PE	M5E2	Maus	IgG_{2a}, κ	1:35	BD Biosciences
CD40	APC	5C3	Maus	IgG_1, κ	1:70	BD Biosciences
CD3	PerCP	SK7	Maus	IgG_1, κ	1:35	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
HLA-DR	PerCP	L243	Maus	IgG_{2a}, κ	1:35	BD Biosciences
CD184 (CXCR4)	APC	12G5	Maus	IgG_{2a}, κ	1:35	BD Biosciences
CD197 (CCR7)	APC PE	3D12	Ratte	IgG_{2a}, κ	1:35	BD Biosciences

* 2 µl oder 4 µl Antikörper pro 1 x 10^5 Zellen

B.3.9.2. Sekundäre Antikörper

Tabelle B.9: Verwendete sekundäre Antikörper

Spezifität	Markierung	Anti-Spezies	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
IgG, IgM, IgA	FITC	Mensch	Ziege	1:50	BioCat, Heidelberg, Deutschland
Polyklonale Immun-globuline	FITC	Maus	Kaninchen	1:25	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland

B.3.9.3. Hybridom Antikörper

Tabelle B.10: Verwendete primäre Hybridom-Antikörper

Spezifität	**ATCC® Nummer (Bezeichnung)**	**Hybridom-Zelle**	**Spezies**	**Isotyp**	**Verdünnung**	**Bezugs-quelle**
HLA-A2	HB-82™ BB7.2	B-Lymphozyt	Maus	IgG_{2b}	pur	ATCC®, Wesel, Deutschland
HLA-ABC	HB-95™ W6/32	B-Lymphozyt	Maus	IgG_{2a}	pur	ATCC®
ICAM-1 (CD54)	HB-9580™ R6.5.D6.E9.B2 [R6-5-D6]	B-Lymphozyt	Maus	IgG_{2a} κ	pur	ATCC®

B.3.10. Kryokonservierung von Zelllinien

Zur Langzeitlagerung wurden die Zelllinien und PBL (Abschnitt B.3.1.) in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Damit sich keine Eiskristalle im Medium beim Einfrierprozess bilden, wurde 20% DMSO in RPMI (ohne Glutamin), welches 1:1 mit FCS gemischt wurde, als Gefrierschutzmittel zugesetzt. DMSO verhindert die Eiskristallbildung in den Einfriermedien, welche Zellorganellen zerstören und so zum Absterben der Zellen führen könnte. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt, da DMSO bei RT toxisch auf die Zellen wirkt. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in FCS resuspendiert und die gleiche Menge des RPMI-DMSO Gemischs zugegeben. Die Zellsuspension wurde dann in Aliquots in 1,8 ml Kryoröhrchen überführt. Um eine zu schnelle Abkühlung der Zellen zu verhindern, wurden die Röhrchen zuerst in Zellstoff gewickelt einige Tage bei -80°C gehalten, bevor sie zur Langzeitlagerung in einen Tank mit flüssigem Stickstoff (Leica, Jung CM 3000 Leica Vertrieb GmbH, Bensheim, Deutschland) überführt wurden.

B.3.11. Auftauen von Zelllinen

Die Zelllinien wurden in flüssigem Stickstoff gelagert und bei 37°C im Wasserbad möglichst schnell aufgetaut. Unmittelbar danach wurden sie in 1 ml D-PBS aufgenommen und zentrifugiert (470 x g, 5 min, Heraeus Megafuge 2.0R). Nach Absaugen des Überstands wurden die Zellen im gewünschten Medium (Abschnitt B.3.2.) aufgenommen.

B.3.12. Bestrahlung der Zellen für die Restimulation

Um die Proliferation der Zellen bei der Restimulation zu unterbinden, wurden diese mit einer Cäsium-Quelle ^{137}Cs (Bestrahlungsanlage HWM-D-2000, Gammacell, Ottawa, Kanada) bestrahlt. Die Bestrahlung der Tumorzellen erfolgte mit 100 Gy, während die B-LCL LAZ 388-Zellen mit 150 Gy bestrahlt wurden und der PBL-Pool mit 50 Gy.

B.3.13. Kultivierung der B-Zelllinie

Die humane lymphoblastoide B-Zelllinie (B-LCL LAZ 388) wurde durch Transformation mit dem Epstein-Barr-Virus immortalisiert und kann somit in Kultur wachsen. Diese Zelllinie wurde in 20-30 ml B-LCL-Medium (Abschnitt B.3.2.) in Zellkulturflaschen stehend kultiviert. Verbrauchtes Medium wurde im regelmäßigen Turnus durch frisches ersetzt. Bei zu dichtem Zellwachstum wurden die Zellen alle 3-4 Tage auf mehrere Zellkulturflaschen verteilt.

B.3.14. Kultivierung und Restimulation von T-Zellklonen

Der zytotoxische T-Zellklon JB4 wurde in 1,5 ml T-Zellklon Medium (Abschnitt B.3.2.) pro Kavität in der 24-well Platte kultiviert. Ungefähr alle 3-4 Tage wurde die Hälfte des Mediums gewechselt, ohne die sich am Boden befindlichen Zellen aufzuwirbeln. Eine definierte Menge an T-Zellklonen wurden alle 10-14 Tage mit einer bestimmten Anzahl an bestrahlten, antigenpräsentierenden Tumorzellen (RCC-26) und mit unspezifischen, bestrahlten Feederzellen (B-LCL LAZ 388 und PBL) restimuliert (Tabelle B.11). Die PBL wurden gleich nach dem Auftauen bestrahlt und verwendet. Die restimulierten T-Zellklone wurden für den Nachweis der T-Zellstimulationsfähigkeit der AHL-behandelten DZ (Abschnitt B.12.) ab Tag 7 eingesetzt.

Tabelle B.11: Verwendete Anzahl der Restimulationszellen

Restimulationszelle	**Zellzahl/Kavität**
RCC-26	60.000
B-LCL LAZ 388	100.000
PBL-Pool	1-1,4 x 10^6

B.3.15. Kultivierung der adhärent wachsenden Tumorzellen

Mel 93.04 A12.1 und RCC-26 gehören zu den adhärent wachsenden Zellen. Für das Wachstum *in vitro* benötigen sie Kulturflaschen mit speziellem Plastikuntergrund, weil sie an diese Oberflächen während der Proliferation binden. Die Kultivierung erfolgte in liegenden Kulturflaschen, da die Adhärenz für die Vitalität der Zellen notwendig ist. Deshalb müssen die Zellen bei dichtem Wachstum auf neue Kulturflaschen verteilt werden. Hierfür wurden 10-15 ml Medium abgesaugt, die Zellen mit D-PBS gewaschen und mit 2 x Trypsin/EDTA in PBS versetzt. Nach einer Inkubation von 5 min bei 37°C wurden die suspendierten Zellen abgenommen und ohne Zentrifugation für die weitere Kultivierung auf die gewünschte Menge Zellflaschen mit frischem Medium aufgeteilt.

B.3.16. Zellzählung bei humanen Zellen

Zur Zellzählung wurde bei jedem Experiment aus einer gut gemischten Zellsuspension eine definierte Menge entnommen und diese mit dem Farbstoff Trypanblau verdünnt (1:2, 1:5 oder 1:10). Da die Zellmembran bei vitalen Zellen undurchlässig für den Farbstoff ist, werden nur abgestorbene Zellen, deren Membrandurchlässigkeit erhöht ist, blau angefärbt. Mit Hilfe eines Neubauer Hämozytometers (improved) wurde die Zellzahl im Lichtmikroskop (Leica DM IL und Leica DMLS, Leica Mikrosysteme, Bensheim, Deutschland), bestimmt. Ausgezählt wurden alle vier Großquadranten und daraus die mittlere Zellzahl bestimmt. Um die Anzahl der Monozyten zu bestimmen, wurde von 10% der Zellen in PBMZ ausgegangen.
Die Gesamtzellzahl pro ml ergibt sich aus der Multiplikation des Mittelwerts der ausgezählten Zellen, dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor (10^4) der Zählkammer.

B.3.17. Isolation und Generierung von humanen Zellen

B.3.17.1. Isolation von PBMZ zur Generierung von DZ

Für die Isolierung von peripheren mononuklearen Blutzellen wurde gesunden, nicht-rauchenden Spendern mittels 50 ml großen Spritzen und Infusionsset die benötigte Menge venöses Blut steril abgenommen. Für die T-Zellstudien (Abschnitt B.12.) wurden HLA-$A2^+$ SpenderInnen ausgewählt. Das heparinisierte Blut wurde in Zellkulturflaschen überführt und 1:1 mit warmem, RPMI-Medium verdünnt. Um die Thrombozyten zu entfernen wurde das Blut zu je 40 ml auf graduierte 50 ml Röhrchen verteilt und bei niedriger Drehzahl zentrifugiert (Rotana 460R und Heraeus Megafuge 2.0R, Hanau, Deutschland bei 100 x g, 25 min, ohne Bremse, 22°C). Der Thrombozytenüberstand wurde danach abgenommen und das sedimentierte Blutgemisch nochmals 1:1 mit warmem, purem RPMI Medium (mit Glutamin) verdünnt. PBMZ wurden durch Überschichtung von 20 ml Ficoll mit 30 ml Blutgemisch und anschließender Zentrifugation (870 x g, 20 min, ohne Bremse, 22°C) gewonnen. Nach der Dichtegradientenzentrifugation haben sich die

Blutzellen aufgetrennt. Es ergibt sich folgende Anordnung: Die unterste Phase enthält die Granulozyten und Erythrozyten. In der Schicht darüber befindet sich das Ficoll (Dichte 1,077 g/ml), gefolgt von der Interphase, die Monozyten und Lymphozyten enthält. Die oberste Schicht enthält das Blutplasma mit den verbliebenen Thrombozyten (Abbildung B.1). Nach Abnehmen der Interphase wurden Ficollrückstände mittels D-PBS weggewaschen (790 x g, 12 min, mit Bremse, 22°C). Anschließend erfolgte noch mal ein Waschschritt, um die restlichen Thrombozyten zu entfernen (120 x g, 15 min, ohne Bremse, 22°C). Das Zellpellet wurde dann in einer definierten Menge DZ-Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

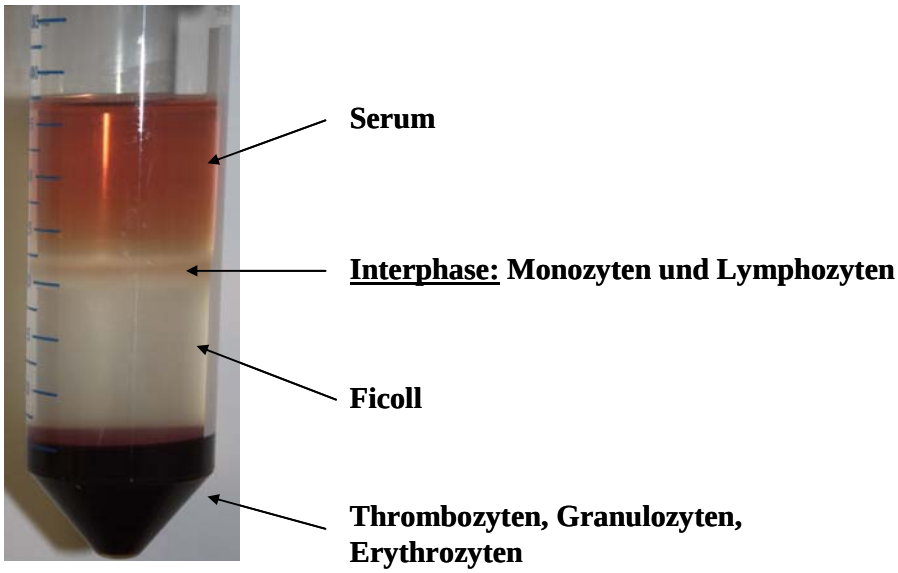


Abbildung B.1: Phasenauftrennung nach der Dichtegradientenzentrifugation

B.3.17.2. Isolation von PBMZ für den Phagozytosetest

Die Isolation der PBMZ erfolgte, wie in Abschnitt B.3.17.1. beschrieben, ohne den ersten Schritt (Entfernung der Thrombozyten).

B.3.17.3. Isolation von Monozyten

Die Isolation der Monozyten (Tag 0) aus den gewonnenen PBMZ (Abschnitt B.3.17.1.) erfolgte mittels Plastikadhärenz und basiert auf der Fähigkeit von Monozyten auf Plastikoberflächen zu adhärieren (Bennett, W. E. *et al.* 1966). Dafür wurde jeweils 1 ml RPMI-Medium (mit Glutamin) pro Kavität in einer 12-well Platte vorgelegt. Die isolierten PBMZ wurden je nach Menge an aufgearbeitetem Blut und benötigter Anzahl an Kavitäten ausgesät (Endvolumen 2 ml). Nach der Hälfte der einstündigen Inkubationszeit im Brutschrank (HeraCell420 und Heraeus BBD 6220) wurde die Platte geschüttelt. Am Ende der Adhärenz wurden die nicht haftenden Zellen in mehreren Waschschritten mit warmem RPMI-Medium (mit Glutamin) abgenommen. Zuletzt erfolgte die Zugabe von 1 ml DZ-Medium mit Zytokinen. Anschließend wurden die Monozyten zur Regeneration ÜN in den Brutschrank bei 37°C gestellt.

B.3.17.4. Generierung von DZ

Unter Zugabe der Zytokine IL-4 und GM-CSF (Tabelle B.4) an den Tagen 0, 1, 3 und 6 wurden aus den isolierten Monozyten unreife DZ generiert. Am ersten Tag nach der Isolation wurde zusätzlich 500 µl frisches DZ-Medium mit Zytokinen zugegeben (Endvolumen 1,5 ml). Dieser Schritt wurde am dritten und sechsten Tag wiederholt, wobei zuvor aus jeder Kavität 500 µl Kulturmedium abgenommen wurden (Endvolumen 1,5 ml). Nach Erreichen des sechsten Tages war die Generierung der unreifen DZ beendet und es konnten Experimente durchgeführt werden.

B.3.18. Stimulation unreifer DZ in Ab- und Anwesenheit von JC bzw. LPS und den verschiedenen AHL

Um zu untersuchen, ob die AHL einen Einfluss auf die Funktion humaner DZ haben, wurden unreife DZ mit 3oxoC_{12}-HSL (Tabelle B.3) unter Ab- oder Anwesenheit von JC (Tabelle B.6) oder LPS (0,1 µg/ml) (Tabelle B.5) kultiviert. Als Kontrollen für Oxo-Substitution bzw. Kettenlänge von 3oxoC_{12}-HSL wurden 3oxoC_4-HSL bzw. C_{12}-HSL

verwendet. JC bzw. LPS wurden genutzt, um die Reifung der DZ zu induzieren. JC ist ein definierter Zytokincocktail, welcher zu einem noch stärkeren Reifungsgrad (Maturationsgrad) der DZ führt als LPS. Er verhindert in höherem Ausmaß die Adhärenz von DZ und macht so eine bessere Ausbeute an reifen DZ möglich (Jonuleit, H. *et al.* 1997). LPS ist ein wichtiger Bestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, welcher die Ausreifung von DZ bewirkt. Für die Stimulation der unreifen DZ am Tag 6 wurden pro Kavität 500 µl DZ-Medium mit Zytokinen vorbereitet und mit den jeweiligen Stimulanzien versehen und gut vermischt. Die Negativkontrolle enthielt keine Stimulanzien, während die Positivkontrolle nur JC bzw. LPS ohne AHL enthielt. Vor Zugabe des Stimulationsansatzes wurden nochmals je Kavität 500 µl Kulturmedium abgenommen. Nach Abschluss der 24-stündigen Stimulation erfolgte die Ernte der nun ausgereiften DZ (Abbildung B.2). Dabei wurden die noch adhärierenden Zellen mit Hilfe eines Schabers sanft von der Plastikoberfläche entfernt. Der Inhalt jeder Kavität wurde in ein graduiertes 15 ml Röhrchen überführt und zentrifugiert (Rotana 460R und Heraeus Megafuge 2.0R bei 790 x g, 12 min, mit Bremse, 22 °C). Nach der Zentrifugation wurden die Überstände für spätere Zytokinmessungen abgenommen, in Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Um die noch verbliebenen DZ von der Platte zu ernten, wurden die leeren Kavitäten mit D-PBS gefüllt. Nach dem Schaben wurde das D-PBS aus den Kavitäten in das jeweilige Röhrchen überführt und nochmals mit 790 x g für 12 min zentrifugiert. Nach erfolgter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in FACS-Puffer (I.) aufgenommen und auf die FACS-Röhrchen verteilt. Zur Analyse des Maturations- und Migrationsmarker mittels eines Durchflusszytometers (FACSCanto oder LSR II System, BD Biosciences) wurden die DZ mit spezifischen, primären oder sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörpern (Tabelle B.8, B.9 und B.10) gefärbt.

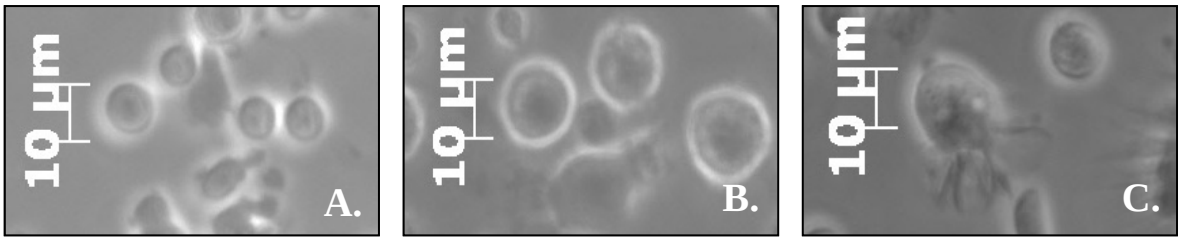


Abbildung B.2: Phasenkontrastaufnahmen von humanen Zellen

A. Adhärente Monozyten (Tag 0)
B. Unreife DZ (Tag 6)
C. LPS-stimulierte, reife DZ mit sichtbaren Verästelungen des Zytoplasmas (Tag 7)

B.4. Färbung der DZ mit Antikörpern

Die 4-Farben Färbung (Tabelle B.12 und B.13) einer definierten Menge DZ zur Analyse der Oberflächenmarker (CD83, CD80, CD86, CD40, CD1a, CD14, CD3, CD184, CD197 und HLA-DR) wurde mit primären, fluoreszenzmarkierten, Maus-Ig (oder Ratte) Antikörper (Tabelle B.8) für 20-30 min im Dunkeln nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

MHC Klasse I-Komplexe und ICAM-1 (CD54) wurden indirekt nachgewiesen. Zuerst wurde eine definierte Menge an DZ mit 50 µl einer unmarkierten, primären Antikörpersuspension (Tabelle B.10) aufgenommen und für 1 h bei RT opsoniert. Nach einem weiteren Waschschritt (Heraeus Megafuge 2.0R bei 470 x g, 6 min, mit Bremse, 22 °C) wurde der sekundäre FITC-markierte, Maus-Ig Antikörper (Tabelle B.9) zugegeben und für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Um unspezifische Antikörperbindungen an Oberflächenmarker der Zellen zu definieren, wurden bei jedem Stimulationsansatz ebenfalls Färbungen mit Isotyp-Kontrollen der entsprechenden Antikörper durchgeführt. Nach der Färbung mit den primären oder sekundären Antikörpern erfolgte ein Waschschritt (Rotana 460R bei 790 x g, 10 min; Heraeus Megafuge 2.0R bei 470 x g, 6 min, mit Bremse, 22 °C) unter Zugabe von D-PBS oder FACS-Puffer (II.). Nach Abnahme des Überstands mit einer Pasteurpipette wurde das Zellpellet in der gewünschten Menge FACS-Puffer (I. oder II.) aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert. Zur Bestimmung der Anzahl der toten Zellen wurde zu einigen Ansätzen kurz vor der Messung eine definierte Menge Propidiumjodid Verdünnung (1:50) zugegeben.

Tabelle B.12: 4-Farben Färbung mit Antikörpern für die Oberflächenmarker

	FITC	**PE**	**APC**	**PerCP**
1. Ansatz	Isotyp	Isotyp	Isotyp	Isotyp
2. Ansatz	CD86	CD80	CD14	HLA-DR
3. Ansatz	CD83	CD1a	CD40	CD3

Tabelle B.13: 4-Farben Färbung mit Antikörpern für die Oberflächenmarker inklusive Migrationsmarker

	FITC	**PE**	**APC**	**PerCP**
1. Ansatz	Isotyp	Isotyp	Isotyp	Isotyp
2. Ansatz	CD86	CD80	**CD184**	HLA-DR
3. Ansatz	CD83	CD1a	**CD197**	CD3

oder

	FITC	**PE**	**APC**	**PerCP**
1. Ansatz	Isotyp	Isotyp	Isotyp	Isotyp
2. Ansatz	CD86	CD80	**CD184**	HLA-DR
3. Ansatz	CD83	**CD197**	CD14	CD3

B.5. Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Technik der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens einer Zellsuspension. Die sich in einer Trägerflüssigkeit befindlichen heterogenen Zellen können nach spezifischen Färbungen quantifiziert und auf molekularer Ebene untersucht werden. Dafür können fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet werden, welche gegen bestimmte Oberflächenproteine der intakten Zellen gerichtet sind. Um unspezifische Antikörperbindungen an die humanen Zellen zu erkennen, wurden pro Stimulationsansatz Färbungen mit den jeweiligen Isotyp-Kontrollen der entsprechenden Antikörper durchgeführt. Während der Messung passieren die Zellen in einem hydrodynamisch fokussierten, laminaren Probenstrom im rechten Winkel eine monochromatische Lichtquelle. Dabei werden sie durch Druck aus dem Probenröhrchen in eine Fließzelle gepresst und dann einzeln seitlich von einem roten Laser (488-nm Argon solid state, 20-mW laser output) oder einem blauen Laser (633-nm HeNe, 17-mW laser output) angestrahlt. Am Messpunkt kreuzen die Partikel das Laserlicht, fluoreszente Marker werden angeregt und das auftreffende Licht gestreut (Streulicht) (Abbildung B.3).

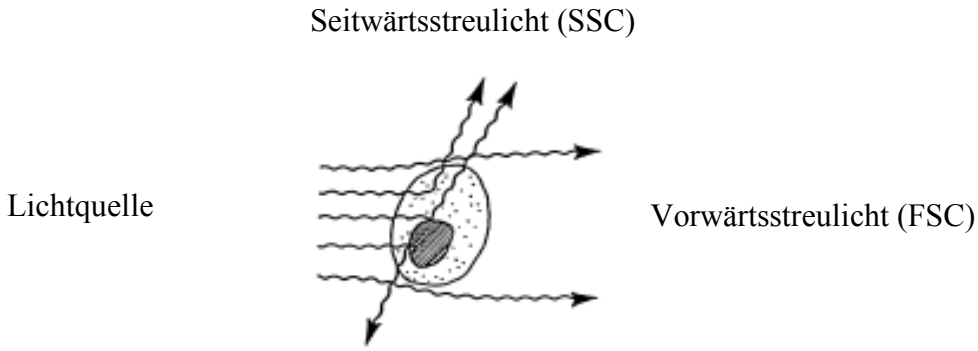


Abbildung B.3: Darstellung des Seitwärtsstreulichts und Vorwärtsstreulichts

Das Maß dieser Streuung korreliert mit der Zellform, der Größe der Zellen, deren Inhalt und Oberflächenbeschaffenheit. Das gestreute Licht und die Fluoreszenz können simultan detektiert werden. Bei Vorwärtsstreulicht (FSC = „Forward Scatter“) wird das vorwärts gestreute Licht des Lasers gemessen (Photodioden-Detektor 488/10 BP). Der FSC gibt Auskunft über die relative Partikelgröße der Zelle. Das im rechten Winkel zum Laserstrahl entstehende Seitwärtsstreulicht (SSC = „Sideward Scatter“) ist proportional zur relativen Granularität (Körnigkeit) oder internen Komplexität der Zelle. Mit dem Photomultiplier-Detektor (PMT 488/10 BP) wird das Seitwärtsstreulicht und die durch Farbteiler und Filter optisch aufgetrennten Emissionspektren der verschiedenen Farbstoffe ermittelt. Da bei den Aufnahmen nur intakte Zellen aufgenommen und kleinere Partikel (Debris) ausgeschlossen werden sollen, wird ein Messparameter (so genannter „Schwellenwert“) auf der x-Achse definiert. Erst oberhalb dieses Schwellenwerts beginnt die Aufnahme der gewünschten Zellen (Abbildung B.4).

Die Messergebnisse werden schematisch in zweidimensionalen Diagrammen (so genannte „Dot Plots bzw. Punktwolken“) dargestellt, wobei das Vorwärtsstreulicht auf der x-Achse und das Seitwärtsstreulicht auf der y-Achse aufgetragen wird. Zellen mit ähnlicher Morphologie erscheinen in Zell- bzw. Punkt-Anhäufungen. Jeder Punkt in diesen Wolken entspricht einem gemessenen Ereignis bzw. einer gemessenen Zelle. Die einzelnen Zellpopulationen können manuell durch Fenster (so genannte „Gates“) eingegrenzt werden (Abbildung B.4 und B.6). Für jeden analysierten Oberflächenmarker gibt es positive und negative Zellen.

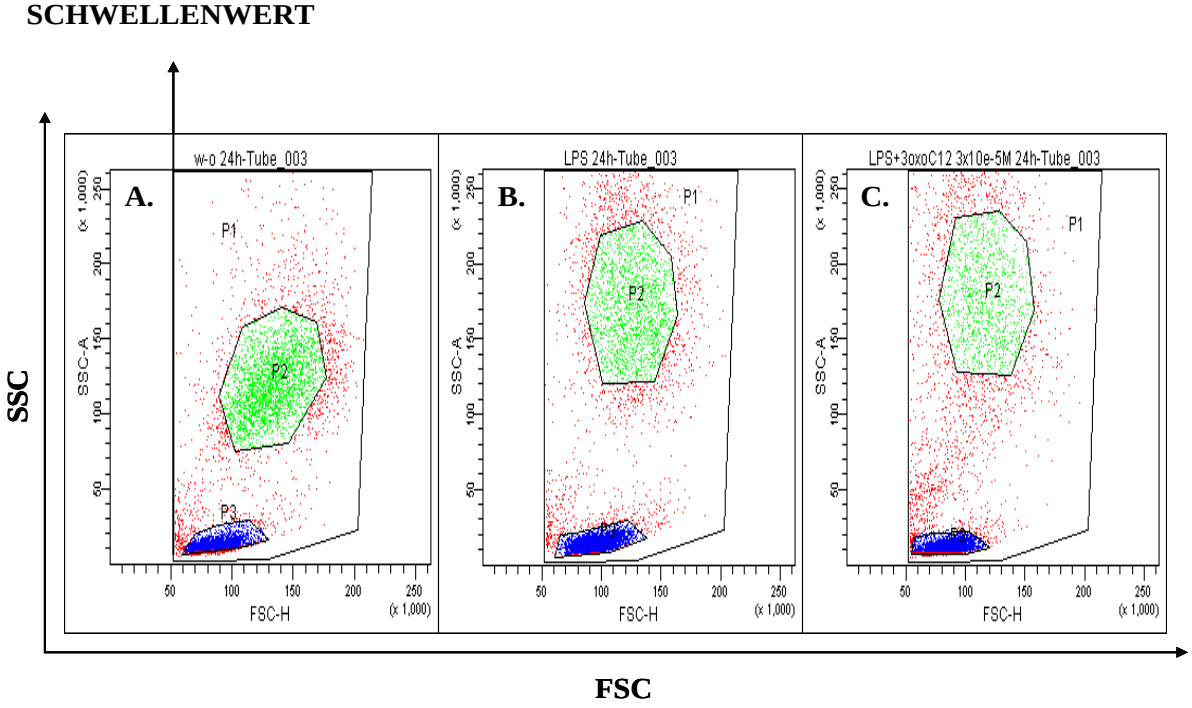


Abbildung B.4: Exemplarische Punktwolkendarstellung der Zellpopulationen (x-Achse: FCS, y-Achse: SSC)

P1 Gate: Alle Zellen, **P2 Gate:** DZ Population, **P3 Gate:** Lymphozyten Population

A. DZ unstimuliert (unreife DZ)
B. DZ stimuliert mit LPS (Positivkontrolle)
C. DZ stimuliert mit LPS + 3oxoC_{12}-HSL

Die Entscheidung, ob eine Zellpopulation für einen gemessenen Marker positiv oder negativ ist, wird anhand der Isotypenfärbung getroffen. Die Fluoreszenzintensität mit dem Isotyp-Antikörper wird als negativ definiert. Jede resultierende Fluoreszenz mit einem weiteren Antikörper ist positiv, wenn sie einen höheren Wert als die Fluoreszenzintensität des Isotyp-Antikörpers erreicht. Mit einer Quadrantenanalyse kann der Prozentsatz einzelner Oberflächenmarker tragender Zellpopulationen bestimmt werden (Abbildung B.5 und B.7). Hierbei werden mit Hilfe eines elektronischen Kreuzes auf der x- und y-Achse doppelt positive, doppelt negative, positive und negative Zellen für zwei analysierte Parameter definiert. Die Darstellung der Datensätze ist ebenfalls in Histogrammen möglich. Hier wird die Häufigkeitsverteilung der Messsignale eines einzelnen Parameters gegenüber der Intensität der Fluoreszenz dargestellt. Die x-Achse gibt dabei die Intensität der Einzelmessungen wieder, die y-Achse die Anzahl der Zellen oder wie in Abbildung B.8 der Fall, die Prozent vom Maximum (% vom Max). In diesem Fall handelt es sich um eine normierte Darstellung, entsprechend dem FlowJo-Algorithmus, da einzelne Graphen mit sehr unterschiedlich hohen Zellzahlen übereinander gelagert wurden.

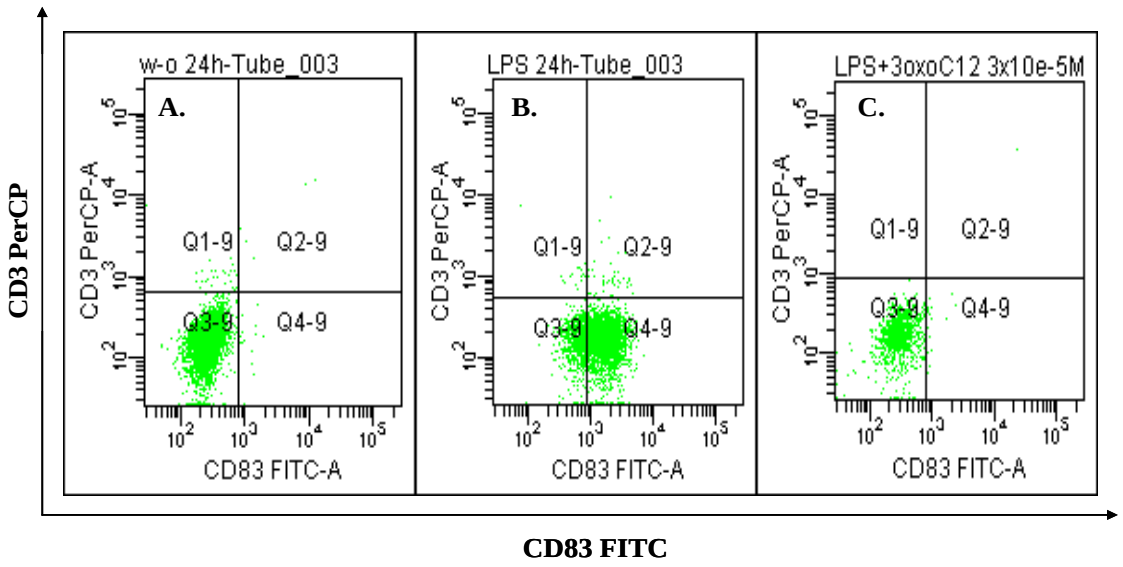


Abbildung B.5: Exemplarische Quadrantenanalyse des P2 Gates
(x-Achse: CD83 FITC, y-Achse: CD3 PerCP)

A. DZ unstimuliert, $CD83^-$ und $CD3^-$ (unreife DZ)
B. DZ stimuliert mit LPS, $CD83^+$ und $CD3^-$ (Positivkontrolle)
C. DZ stimuliert mit LPS + $3oxoC_{12}$-HSL, $CD83^-$ und $CD3^-$

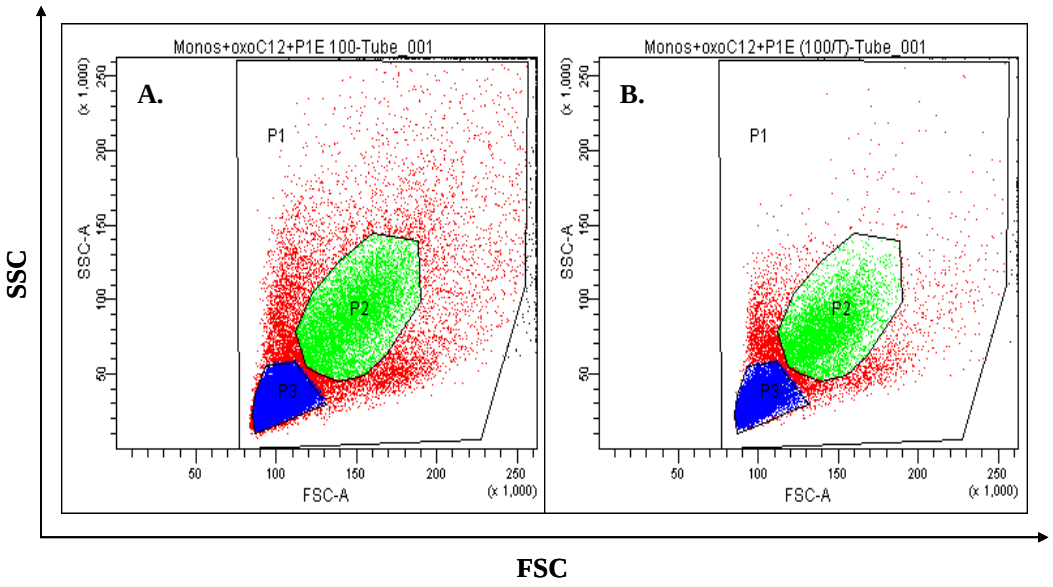


Abbildung B.6: Exemplarischer Vergleich zwischen den P2 Gates ohne bzw. mit Trypanblau
(x-Achse: FSC, y-Achse: SSC)

A. Monozyten stimuliert mit $3oxoC_{12}$-HSL + *P. aeruginosa* P1E-FITC (ohne Trypanblau)
B. Monozyten stimuliert mit $3oxoC_{12}$-HSL + *P. aeruginosa* P1E-FITC (mit Trypanblau)

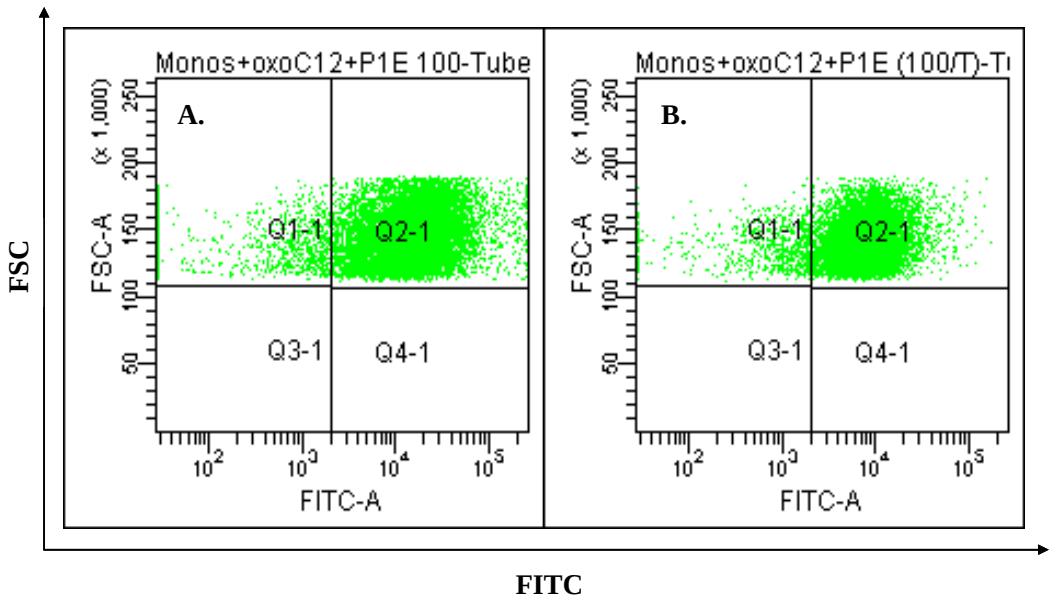


Abbildung B.7: Exemplarischer Vergleich zwischen der Quadrantenanalyse des P2 Gates ohne bzw. mit Trypanblau (x-Achse: FITC, y-Achse: FSC)

A. Monozyten stimuliert mit 3oxoC_{12}-HSL + *P. aeruginosa* P1E-FITC (ohne Trypanblau)
B. Monozyten stimuliert mit 3oxoC_{12}-HSL + *P. aeruginosa* P1E-FITC (mit Trypanblau)

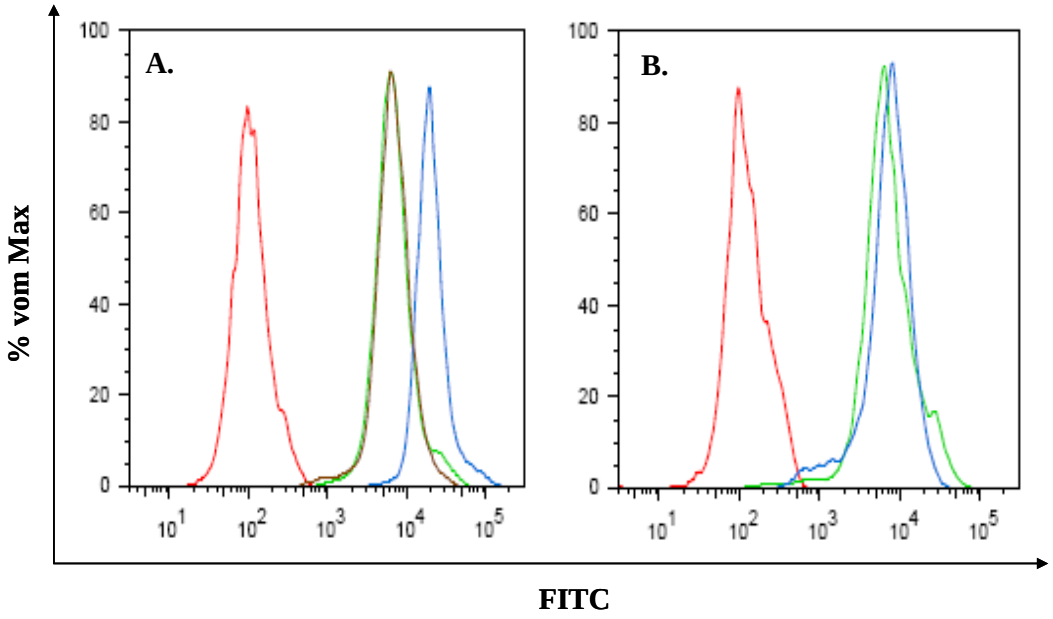


Abbildung B.8: Exemplarische Darstellung der Datensätze in Histogrammen
(x-Achse: FITC, y-Achse: % vom Maximum)

Rot: Isotyp-Kontrolle, **Grün:** HLA-A2, **Blau:** HLA-ABC, **Braun:** ICAM-1 (CD54)

A. DZ unstimuliert (unreife DZ)
B. DZ stimuliert mit 3oxoC_{12}-HSL (ohne LPS)

B.5.1. Anwendung der Durchflusszytometrie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Detektion von Oberflächenmarkern bei den DZ und von interner Fluoreszenz bei Monozyten und DZ größtenteils das Durchflusszytometer FACSCanto (BD Biosciences) eingesetzt. Für die Messung der MHC Klasse I-Moleküle und ICAM-1 bei den DZ wurde das LSR II System (BD Biosciences) am Institut für Molekulare Immunologie in Großhadern verwendet. Die für die Aufnahmen verwendeten fluoreszenzmarkierten primären und sekundären Antikörper und die 4-Farben Färbungen sind in den Tabellen B.8, B.9, B.10, B.12 und B.13 aufgeführt. Für die verwendeten Antikörper wurden die entsprechenden Isotyp-Kontrollen eingesetzt, um unspezifische Bindungen an die humanen Zellen zu definieren.

Da sich bei Mehrfachfärbungen der Zellen manche Fluoreszenzfarbstoffe (Tabelle B.14) spektral überschneiden und manche Zellen auch eine gewisse Autofluoreszenz aufweisen, musste in Vorversuchen der Grad der Signalverstärkung (Spannungseinstellung) ermittelt und eine Kompensation durchgeführt werden. Bei der Kompensation werden überlappende Fluoreszenzanteile subtrahiert. Die so ermittelten Geräteeinstellungen wurden dann für alle weiteren Aufnahmen verwendet.

Auswertungen der FACSCanto-Analysen wurden mit der FACSDiva Software Version 5.0.1 (BD Biosciences) durchgeführt. Für die Analysen am LSR II System wurde das Auswertungsprogramm FlowJo 7.2.4 (©Tree Star, Inc., Ashland, Oregon, USA) angewendet. Generell wurde der Prozentsatz der JC- bzw. LPS-stimulierten DZ (Positivkontrolle) mit dem Prozentsatz der JC- bzw. LPS-stimulierten DZ unter Einfluss der verschiedenen AHL verglichen. Die Negativkontrolle (unstimulierte, unreife DZ) und die Positivkontrolle (stimulierte, reife DZ) der Oberflächenmarker exprimierenden DZ sollten wie in der Tabelle B.15 beschrieben aussehen. Der Anteil von $CD14^+$ Zellen war niedrig. Zusätzlich wurden die Anteile kontaminierender $CD3^+$ T-Zellen ermittelt.

Tabelle B.14: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe in der Durchflusszytometrie

Fluoreszenzfarbstoff	**Laser (nm)**	**Absorptions-maximum (nm)**	**Emissions-maximum (nm)**
FITC Fluoreszein-Isothiocyanat	Argon 488	495	519
PE Phycoerythrin	Argon 488	565	575
APC Allophycocyanin	Helium-Neon 633-635	650	660
PerCP Peridinin-Chlorophyll-Protein Complex	Argon 488	490	675
P.I. Propidiumjodid	Argon 488	538	619

Tabelle B.15: Expressionsmuster der Oberflächenmarker bei unreifen und reifen DZ

Oberflächenmarker	**Expression**	
	unreifer DZ	**reifer DZ**
CD83	niedrig	hoch
CD80	moderat	hoch
CD86	moderat	hoch
CD40	hoch	hoch
ICAM-1 (CD54)	niedrig	hoch
CD184 (CXCR4)	niedrig	hoch
CD197 (CCR7)	niedrig	hoch
HLA-DR (MHC Klasse II)	hoch	hoch
HLA-A2 (MHC Klasse I)	hoch	hoch
HLA-ABC (MHC Klasse I)	hoch	hoch

B.6. Bestimmung der optimalen AHL- und LPS-Konzentration

Die generierten, unreifen DZ (Abschnitt B.3.17.4.) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an AHL (0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 30 µM, 60 µM und 100 µM) und LPS (0,05 µg/ml oder 0,1 µg/ml) stimuliert (Abschnitt B.3.18.), um geeignete Konzentrationen der Stimulanzien für alle weiteren Versuche festzulegen.

B.7. Durchführung von Vitalitätstests mit DZ

Um toxische Effekte der AHL auf die DZ auszuschließen, wurde ein CellTiter-Blue® Vitalitätstest (Tabelle B.16) durchgeführt. Der Test enthält den Indikator Resazurin, welcher eine geringe intrinsische Fluoreszenz besitzt und zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität eingesetzt wird. Lebende Zellen reduzieren dunkelblaues Resazurin in farbiges Resorufin (Absorptionsmaximum 579 nm, Emissionsmaximum 584 nm), welches hoch-fluoreszierende Eigenschaften besitzt. Nicht lebensfähige Zellen verlieren schnell ihre metabolische Aktivität und eine Reduktion der Indikatorsubstanz ist deshalb nicht mehr möglich. Die Höhe der Fluoreszenzintensität an gebildetem Resorufin kann photometrisch bestimmt werden und ist direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen und ihrer Stoffwechselleistung.
DZ wurden wie im Abschnitt B.3.17.4. beschrieben generiert und stimuliert (Abschnitt B.3.18.). Nach 22 h Stimulation wurden 300 µl CellTiter-Blue®-Reagenz pro Kavität hinzugegeben. Der Ansatz wurde für weitere 2 h im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte die Evaluation der Zelllebensfähigkeit photometrisch mit dem Multiplatereader Mithras LB 940 (Berthold Technologies GmbH und Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland).

Tabelle B.16: Verwendeter Kit für den Vitalitätstest

Kit	Inhalt	Firma
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	CellTiter-Blue® Reagenz	Promega, Madison, WI, USA

B.8. Zytokinquantifizierung mittels Bio-Plex

Zytokine sind Peptidwirkstoffe, so genannte „Mediatoren“, welche von stimulierten Zellen ins umliegende Medium sezerniert werden. Sie haben regulatorische Funktionen und sind deshalb essentiell für die Steuerung immunologischer Reaktionen. Durch interzelluläre Kommunikation regen sie Zielzellen zur Proliferation und Differenzierung an. Das Zytokinprofil ist somit neben der Expression von typisch morphologischen Merkmalen ein weiterer entscheidender Indikator für den Aktivierungs- und Differenzierungsgrad von Immunzellen. Zur quantitativen Bestimmung der Zytokine können so genannte „Bio-Plex Pro™ Zytokintests“ benutzt werden, welche nach dem Prinzip eines Sandwich-ELISA („Enzyme Linked Immunosorbent Assay“) funktionieren und den Vorteil besitzen, dass mehrere Zytokine gleichzeitig gemessen werden können. Antikörper gegen das gewünschte Zytokin sind kovalent an farbkodierte Polystyrol-Beads gekoppelt, welche mit den jeweiligen Zielmolekülen im Kulturüberstand reagieren. Nach mehreren Waschschritten, um ungebundene Proteine zu entfernen, wird ein weiterer biotinylierter Detektionsantikörper zugegeben, welcher mit anderen spezifischen Epitopen auf den Zytokinen reagiert. Somit sind die Zielmoleküle umlagert von Antikörpern. Dieses Konstrukt kann mit einem Streptavidin-Phycoerythrin Reporter Komplex, der an den Detektionsantikörper bindet, sichtbar gemacht werden. Zur Messung wird ein flow-based Microreader System mit einem dualen Laser benötigt. Dieses detektiert die Fluoreszenz der individuell gefärbten Beads sowie auch die Fluoreszenz des Reportersignals. Dabei erlaubt die Zahl der gebundenen biotinylierten Antikörper die Quantifizierung und die spezifischen Beadfarben die Identifizierung der einzelnen Zytokine.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Charakterisierung des immunmodulatorischen Effekts der AHL auf DZ ein Bio-Plex Pro™ Zytokintest (Bio-Rad Laboratories Inc.) (Tabelle B.17) verwendet. Dafür wurde nach 24 h Stimulation der DZ mit JC bzw. LPS, ohne bzw. mit Zugabe von den jeweiligen AHL, der Kulturüberstand abgenommen und bei -20°C gelagert.

Zu Beginn des Bio-Plex Pro™ Zytokintests wurde der lyophilisierte Standard, eine Mischung aus 27 Zytokinen in bekannten Konzentrationen in 500 µl RPMI-Medium aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Standards 8x seriell verdünnt (1:4). Anti-Zytokin konjugierte Beads (25-fach konzentriert) wurden mit Bio-Plex Pro™ Testpuffer verdünnt. Zur Befeuchtung der Filter in der Platte wurden 100 µl

Testpuffer pro Kavität in die 96-well Platte pipettiert und mittels einer Vakuumpumpe abgesaugt. Dann wurden 50 µl der verdünnten Beads je Kavität zugegeben und der Puffer durch Absaugen entfernt. Nach zweimaligem Waschen mit 100 µl Waschpuffer pro Kavität wurden 50 µl/Kavität der Standards und der zu testenden Proben aufgetragen. Nach kurzem Aufschütteln wurde die Platte bei 300 rpm für 30 min auf dem Plattformschüttler im Dunkeln inkubiert. Die benötigten Antikörper zur Detektion wurden kurz vor Anwendung mit einer vorgefertigten Lösung verdünnt. Nach drei Waschschritten wurde 25 µl der verdünnten Antikörperlösung pro Kavität zugegeben und weiter auf dem Plattformschüttler (300 rpm) im Dunkeln inkubiert. Die danach benötigte Detektionslösung wurde ebenfalls erst kurz vor Anwendung vorbereitet. Hierzu wurde eine 1:100 Verdünnung des Streptavidin-PE mit Puffer hergestellt. Nach der Inkubationszeit wurde die Filterplatte 3x gewaschen und 50 µl der Streptavidin-PE Lösung pro Kavität zugegeben. Nach Inkubation für 10 min bei 150 rpm auf dem Plattformschüttler im Dunkeln wurden nicht gebundene Moleküle durch dreimaliges Waschen entfernt. Beads wurden in je 125 µl Testpuffer pro Kavität resuspendiert und die 96-well Filterplatte bis zur Messung im Dunkeln bei +4°C gelagert. Nach kurzem Aufschütteln der Platte erfolgte die Messung der Fluoreszenzintensität (FI) mit dem Luminex 200 (Luminex, Oosterhout, Holland). Zur Auswertung wurde das Bio-Plex Manager Software Paket 4.1 von Bio-Rad (München) genutzt.

Tabelle B.17: Verwendeter Kit für die Zytokinquantifizierung

Kit	**Inhalt**	**Firma**
Bio-Plex Pro™Assay	Bio-Plex Human Cytokines Group 9-plex 1 x 96-well IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12(p70) IL-13, IFN-gamma, MIP-1alpha, TNF-alpha Bio-Plex Cytokine Reagent Kit 1 x 96-well	Bio-Rad Laboratories Inc., München, Deutschland

B.9. Durchführung von Migrationstests

Ein Parameter für den Grad der Differenzierung der DZ ist ihre Fähigkeit, entlang eines chemotaktischen Gradienten in sekundäre lymphatische Organe zu wandern. Als Migrationsstimulus eignet sich das Chemokin CXCL12, auch SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) genannt, welches *in vivo* von Stromazellen und speziellen Gefäßzellen des Lymphknotens gebildet wird und dem Liganden für CXCR4 entspricht (Janeway, C. A. *et al.* 2009). CXCL12 bindet an den membranständigen Zytokinrezeptor CXCR4 (CD184) reifer, antigenbeladener DZ, sowie antigenbeladener B-Lymphozyten und CXCR4-positiver Effektor-T-Zellen. Die Zellen wandern daraufhin über die Lymphe in sekundäre lymphatische Gewebe und in die Organe.

Um das Migrationsverhalten der DZ unter Einfluss von AHL zu testen wurden aus peripheren Monozyten DZ generiert und in einer 12-well Platte mit 3oxoC_4-HSL, C_{12}-HSL und 3oxoC_{12}-HSL sowie mit JC stimuliert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet. Um die adhärenten DZ von der Plastikfläche zu lösen, wurde pro Kavität 1 ml EDTA (5 mM) für 15 min zugegeben, danach wurden mit einem Zellschaber die restlichen Zellen von der Platte geschabt. Anschließend wurden die Kavitäten zweimal mit 1 ml Medium gewaschen. Die Überstände der Waschschritte wurden mit den geernteten Zellen in den jeweiligen 50 ml Röhrchen vereinigt und zentrifugiert (Rotana 460R bei 420 x g, 6 min, 22°C). Nach Abnahme der Überstände wurde die Zellzahl auf 200.000 Zellen pro 200 µl Medium eingestellt. Die Zellsuspensionen wurden in Transwell®-Einsätze (obere Kammer) gegeben und auf eine Kavität (untere Kammer) in der Transwell®-Platte gesetzt. Die Transwell®-Einsätze erlauben den Zugang der DZ zu dem unteren Kompartiment, in dem sich 600 µl Medium, ohne und mit Chemokin (100 ng/ml) (Tabelle B.7) befanden. Um die ungerichtete bzw. spontane Migration (Chemokinese) der DZ aufgrund von unspezifischer Aktivierung darzustellen, wurde in einigen Ansätzen auf das Chemokin (-CXCL12) verzichtet. Die Inkubationszeit betrug 2 h bei 37°C im Brutschrank (HeraCell240). Danach wurde die Transwell®-Platte 10 min auf den Plattformschüttler (Rotamax 120, Heidolph-Instruments, Kelheim, Deutschland) bei 100 rpm gestellt, dann die Transwell®-Einsätze entfernt und mit Hilfe des Cellscreens (Roche Innovatis AG, Bielefeld, Deutschland) nicht-invasiv und automatisch die migrierten Zellen im unteren Kompartiment ausgezählt. Bei der Auswertung der Daten (Abschnitt B.14.) wurden die DZ, welche ohne bzw. mit

Chemokinzugabe migrierten, immer auf die korrespondierende Kontrolle (-CXCL12 bzw. +CXCL12) bezogen.

B.10. Durchführung von Phagozytosetests

Monozyten und DZ nehmen Pathogene mittels Phagozytose auf. Grundvoraussetzung dafür ist die Bindung des Pathogens an die Zelloberfläche der humanen Zelle. Dies wird über die Bindung von antigenspezifischen Oberflächenstrukturen des Pathogens erreicht. Eine weitere Möglichkeit der Bindung besteht über Opsonierung der Mikroorganismen mittels Antikörper. Durch Einstülpung der Zellmembran an der Kontaktstelle zwischen Pathogen und DZ werden Phagosomen gebildet. Diese verschmelzen mit Lysosomen, welche Säuren beinhalten. So können die Mikroorganismen abgetötet werden.
Um die Wirkung der AHL auf das Phagozytoseverhalten der genannten APZ zu testen, wurden die Zellen nach dem beschriebenen Prinzip isoliert bzw. erzeugt (Abschnitt B.3.17.).
Da das Generieren von dendritischen Zellen sehr zeitintensiv ist, wurden Vorversuche mit Monozyten durchgeführt. Monozyten wurden am Tag 0 und DZ am Tag 6 mit Pseudomonaden abhängig von einer bestimmten MOI („Multiplicity of Infection“) in FACS-Röhrchen (ohne Deckel) für 1,5 h koinkubiert. Dies erfolgte in RPMI (1 ml Ansatz), unter Zugabe von AHL (60 µM) bei 37°C im Brutschrank (HeraCell240). Dafür wurden vorher die Zellzahl der humanen Zellen (Abschnitt B.3.16.) und der Bakterien (Abschnitt B.1.6.) bestimmt. Die Tabelle B.18 fasst die MOI, die verwendeten Organismen und die jeweiligen humanen Zellen zusammen. Nach der Inkubation der eukaryotischen Zellen mit den FITC-markierten Bakterien (Abschnitt B.1.7.) im Brutschrank (Abbildung B.9) wurde mit 2 ml kaltem D-PBS gewaschen (Rotana 460R bei 420 x g, 6 min, 22°C), der Überstand mit einer Saugpumpe abgenommen und das Pellet schließlich in 200 µl D-PBS resuspendiert. Die Fluoreszenz der Bakterien, welche extrazellulär an der humanen Zellwand adhärieren, wurde mit einer 0,4%igen Trypanblau-Lösung kurz vor der Messung ausgelöscht (Sahlin, S. *et al.* 1983). Dafür wurden von der Zellsuspension 100 µl entnommen und 1:1 mit Trypanblau verdünnt. Anschließend wurde sofort die intrazelluläre Fluoreszenz der humanen Zellen am Durchflusszytometer (FACSCanto) (Abbildung B.6) analysiert. Im Anschluss erfolgte die Messung der Proben ohne Trypanblau. Aufnahmen

der Phagozytose von FITC-markierten oder GFP-markierten Pseudomonaden durch Monozyten oder DZ wurden mit Hilfe von Epifluoreszenz- und konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (Abschnitt B.11.1. und B.11.5.) gemacht. Bei der Auswertung der Daten (Abschnitt B.14.) wurden die Proben, welche ohne bzw. mit Trypanblau gemessen wurden, immer auf die korrespondierende Kontrolle (-T bzw. +T) bezogen.

Tabelle B.18: Inkubationsdauer, verwendete Organismen und MOI für den Phagozytosetest mit humanen Zellen

Humane Zelle	Mikroorganismus	Inkubationsdauer (h)	MOI
Monozyten	*Pseudomonas* spec. DSMZ 13134 Plasmid pJBA28, GFP-markiert	**1,5**	**1:100**
	Pseudomonas spec. DSMZ 13134	**1,5**	**1:100**
	Pseudomonas aeruginosa P1E	**1,5**	**1:100**
DZ	*Pseudomonas* spec. DSMZ 13134	**1,5**	**1:100**
	Pseudomonas aeruginosa P1E	**1,5**	**1:100**

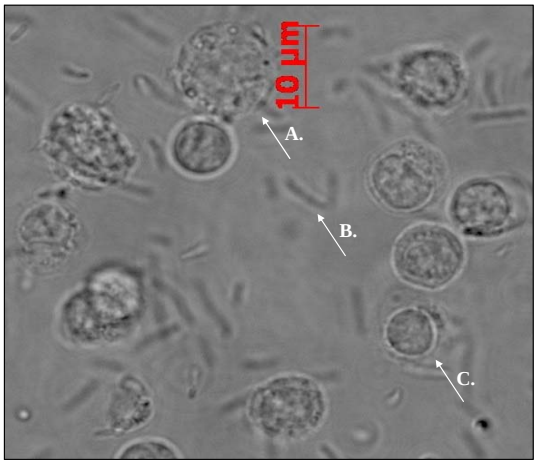


Abbildung B.9: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme von PBMZ inkubiert mit *Pseudomonas* spec. DSMZ 13134

A. Monozyt
B. *Pseudomonas* spec.
C. Kontaminierender Lymphozyt

B.10.1. Anfärben von Monozyten

Zur Sichtbarmachung der Monozyten und von GFP-markierten *P.* spec. DSMZ 13134 in den Phagosomen, wurden nach der angegebenen Inkubationszeit und einem Waschschritt die Monozyten mit dem primären Antikörper CD14 PE oder CD14 APC (Tabelle B.8) für 20-30 min im Dunkeln nach Protokoll des Herstellers gefärbt. Nach der Färbung erfolgte ein weiterer Waschschritt. Danach wurden Aufnahmen der Monozyten mit dem Epifluoreszenzmikroskop und dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (CLSM) (Abschnitt B.11.1. und B.11.5.) gemacht.

B.10.2. Anfärben der Lysosomen von Monozyten

Für Kolokalisationsstudien von Phagosomen und Lysosomen der eukaryotischen Zellen wurden die Lysosomen mit einem fluoreszierenden Lysotracker® Red DND-99 (Molecular Probes) nach Protokoll des Herstellers angefärbt. Dieser fluoreszierende Farbstoff ist frei permeabel und azidotroph. Er dringt durch die Zellmembran lebender Zellen ein und färbt zelluläre Kompartimente mit niedrigem pH-Wert an. So kann die Biosynthese und Pathogenese der Lysosomen von Zellen analysiert werden. Ausgewertet wurde mit einem Epifluoreszenzmikroskop (Abschnitt B.11.1.).

B.10.3. Pappenheim-Färbung der PBMZ

Zum weiteren Nachweis der Phagozytose von *P.* spec. DSMZ 13134 durch Monozyten wurde eine Pappenheim-Färbung mit luftgetrockneten PBMZ-Ausstrichen durchgeführt. Hierbei handelt sich um eine so genannte „panoptische Differentialfärbung“, die zellinterne Strukturen sichtbar macht. Die verwendeten Pappenheim-Farblösungen setzen sich aus May-Grünwald und Giemsa zusammen. Wasser und Methanol dienen als Lösungsmittel und Fixativ. Basische Farbstoffe, wie z.B. Methylenblau, in dem Farblösungsgemisch bilden in wässriger Lösung aktive Farbstoffanteile mit positiver Ladung, welche negativ geladene Zellbestandteile anfärben. Saure Farbstoffe, wie z.B.

Eosin, im Gemisch zerfallen in wässriger Lösung in aktive Bestandteile mit negativer Ladung und färben Eiweißstrukturen mit positiver Ladung in den Zellen an.
Für die Fixierung der Zellen wurden etwa 250.000 Zellen in 250 µl PBS gelöst und für 3 min bei 1000 rpm in der Zytospin-Zentrifuge (Shandon Elliott Instruments Limited, Pittsburgh, PA, USA) auf einen Objektträger (Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland) aufgetragen.
Nach einer vollständigen Trocknung bei RT über Nacht erfolgte die Färbung, welche freundlicherweise von dem Satelliten-Labor (Hämatologie und klinische Chemie) des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der LMU durchgeführt wurde. Vor der Hellfeldmikroskopie (Abschnitt 11.2.) wurde das Objektglas auf dem Objektträger mit einem Tropfen Entellan fixiert. Bei Entellan handelt es sich um ein absolut transparentes Schnelleindeckmittel aus einer Kombination von mehreren Kunstharzen.

B.11. Mikroskopische Methoden

B.11.1. Epifluoreszenzmikroskopie

Die interne Fluoreszenz der Phagolysosomen (Phagosomen + Lysosomen) (Deretic, V. 2008) der Monozyten wurde mit einem Epifluoreszenzmikroskop (Auflichtmikroskop) der Firma Zeiss (Axioplan, Carl Zeiss AG, Jena Deutschland) dargestellt. Zur Auswertung wurde ein Öl-Immersionsobjektiv (Plan-Neofluar Objektiv, Carl Zeiss AG, numerische Apertur 1,3) mit 100-facher Vergrößerung verwendet. Das Anregungslicht wurde durch eine Quecksilberdampflampe ($HBO50_{/AC}$, Carl Zeiss AG) erzeugt. Quecksilberdampflampen emittieren über das gesamte sichtbare Spektrum sowie im ultravioletten Bereich Licht. Optische Filter (Carl Zeiss AG) isolieren die notwendige Wellenlänge zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe (Tabelle B.19). Der sich im Strahlengang befindliche Farbteiler trennt anschließend das emittierte, langwellige Fluoreszenzlicht vom anregenden Licht und leitet es in das Okular des Mikroskops auf eine Fotokamera (analog oder digital) oder auf einen elektronischen Verstärker (so genannte „Photomultiplier“) weiter.
Die Bilder wurden mit Hilfe einer schwarz/weiß Kamera (AxioCam MRm, Carl Zeiss AG) gemacht und mit der AxioVision Rel 4.6.3 der Carl Zeiss AG bearbeitet.

Tabelle B.19: Kenndaten der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sowie entsprechende Filtersätze bei der Epifluoreszenzmikroskopie

Fluorochrom	**Absorptions-maximum (nm)**	**Emissions-maximum (nm)**	**Anregungs-filter**	**Farbteiler**	**Emissions-filter**
Lysotracker® Red DND-99	578	589	BP 545/25	570	BP 605/70
PE	565	575	BP 545/25	570	BP 605/70
GFP	489	509	BP 470/40	495	BP 525/50

B.11.2. Hellfeldmikroskopie

In der Hellfeldmikroskopie werden gefärbte Objekte auf hellem Grund sichtbar gemacht. Diese Art der Mikroskopie wurde verwendet, um humane Zellen darzustellen, die mit Pappenheim Lösungen behandelt wurden. Dafür wurde ein Axioskop der Firma Carl Zeiss AG verwendet, welches mit einer Farbkamera (Sony 3CCD Color Video Camera, AVT Horn, Aalen, Deutschland) ausgestattet ist. Die gefärbten PBMZ wurden im Durchlichtverfahren bei 100-facher Vergrößerung durch das Öl-Immersionsobjektiv (Plan-NEOFLUAR Objektiv, Carl Zeiss AG, numerische Apertur 1,3) dargestellt. Die Bilder wurden mit der AxioVision 3.0 Software (Carl Zeiss AG) aufgenommen und bearbeitet.

B.11.3. Phasenkontrastmikroskopie

Die Phasenkontrastmikroskopie beruht auf dem unterschiedlichen Brechungsindex von verschiedenen Zellbestandteilen im Durchlicht. Dieser Unterschied im Brechungsindex kann von der Blendenoptik des Mikroskops als Helligkeitsänderung dargestellt werden.
Phasenkontrastaufnahmen der humanen Zellen in den Kavitäten wurden mit einem Axiovert 135 der Firma Carl Zeiss AG mit einer schwarz/weiß Kamera (AxioCam MRm, Carl Zeiss AG) durchgeführt. Dafür wurde ein Objektiv mit 40-facher Vergrößerung (LD A-Plan 40x/0,50, Carl Zeiss AG) mit Phase 2 verwendet. Die Bilder wurden mit der AxioVision Release 4.5 Software von der Carl Zeiss AG aufgenommen.

B.11.4. Stereomikroskopie

Das Stereomikroskop gehört zu der Klasse der Auflichtmikroskope und besitzt im Gegensatz zum einfachen Binokular eine zweistufige Vergrößerung, welche durch das Objektiv (NeoLumar S 0,8x FWD 80 mm, Carl Zeiss AG) und Okular (W-PL 10x/23, Carl Zeiss AG) erreicht wird. In dieser Arbeit wurde das Stereomikroskop (Lumar.V12, Carl Zeiss AG) verwendet, um die GFP-Fluoreszenz (Tabelle B.20) von *P. putida* F117 in 8-facher Vergrößerung auf Festmedien sichtbar zu machen.

Tabelle B.20: Kenndaten des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes, sowie entsprechendem Filtersatz bei der Stereomikroskopie

Fluoro-chrom	**Absorptions-maximum (nm)**	**Emissions-maximum (nm)**	**Anregungs-filter**	**Farbteiler**	**Emissions-filter**
GFP	489	509	BP 450-490	510	LP 515

B.11.5. Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Ein großer Vorteil dieser lichtmikroskopischen Methode ist die erhöhte optische Auflösung und die Möglichkeit, optische Serienschnitte durch Zellen oder Gewebe zu machen. Es entstehen zwei-dimensionale Schnittbilder, die mit einer entsprechenden Software drei-dimensional rekonstruiert werden können. Als Lichtquelle wird ein Laser verwendet. Mit Hilfe einer so genannten „Lochblende“, die in ihrem Durchmesser veränderbar ist, wird nur diejenige Objektebene fokussiert, die auch beleuchtet wird. Dies führt zu wenig Streulicht von tieferen und höheren Objektebenen, so dass Schärfe und Kontrast des Bildes wesentlich erhöht werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das LSM-510 der Firma Zeiss zur Betrachtung von Monozyten und Detektion der Phagosomen verwendet. Dabei dienten ein Argon- (488 nm) und zwei Helium-Neon-Laser (543, 633 nm) als Lichtquelle; es wurden ein Wasserimmersionsobjektiv C-Apochromat® 63x/1,2 W Korr mit 63-facher Vergrößerung und einer numerischen Apertur von 1,2 benutzt. Die Bildaufnahme und -verarbeitung

erfolgte mit dem Softwarepaket von Zeiss (LSM Image Browser Version 2.80). Die verwendeten Fluorochrome, Laser und Filtersätze sind in Tabelle B.21 aufgelistet.

Zur bildlichen Darstellung der dendritischen Zellen wurde das inverse IX81 konfokale Mikroskop FluoView FV 1000 von Olympus (Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) benutzt. Dieses Mikroskop verfügt über einen Multi-line Argon Laser (457 nm, 488 nm, 515 nm), die Filtersatzwahl wird von der Olympus-Software (FV10-ASW Ver.02.00) automatisch gesteuert (Tabelle B.22). Zur Aufnahme wurde ein Öl-Immersionsobjektiv mit 60-facher Vergrößerung (Olympus 60x/1,35 UPlanSApo) benutzt. Die aufgenommenen Bilder wurden als TIF-Bilder gespeichert und mit dem Softwarepaket ImageJ 1.38e bearbeitet.

Tabelle B.21: Kenndaten der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und entsprechende Laser, Strahlenteiler und Filter bei der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie (LSM-510)

Fluorochrom	**Absorptions-maximum (nm)**	**Emissions-maximum (nm)**	**Laser (nm)**	**Strahlen-teiler**	**Filter**
APC	650	660	Helium-Neon 633	HFT UV 488/543/ 633	BP 650
GFP	489	509	Argon 488	NFT 490 HFT 488/543	BP 500-550

Tabelle B.22: Kenndaten der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und entsprechende Laser, Kondensor und Filter bei der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie (FluoView FV 1000)

Fluorochrom	**Absorptions-maximum (nm)**	**Emissions-maximum (nm)**	**Laser (nm)**	**Kondensor**	**Filter**
FITC	495	519	Argon 488	DIC60	BA505-605

B.12. Nachweis der T-Zellstimulationsfähigkeit von DZ

Die Fähigkeit von DZ $CD8^+$ T-Zellen zu stimulieren, hängt u.a. von der Menge der an der Oberfläche vorhandenen MHC I-Peptidkomplexe und Adhäsionsmolekülen ab. $CD8^+$ T-Zellen produzieren bei Stimulation Zytokine u.a. IFN-gamma. Die Menge des produzierten IFN-gamma kann als Maß benutzt werden, wie gut eine DZ (oder andere Zelle) die T-Zellen stimuliert.

Zum Nachweis der T-Zellstimulationsfähigkeit der AHL-behandelten DZ wurde der zytotoxische JB4-T-Zellklon ($CD8^+$) verwendet, welcher über HLA-A2 Moleküle der antigenpräsentierenden Zellen stimuliert wird. Der Ansatz wurde in der 96-well Platte durchgeführt. Nach Aussaat der unstimulierten AHL-behandelten $HLA\text{-}A2^+$ DZ im Duplikat (20.000/100 µl Zellen pro Kavität) wurden 5.000/100 µl JB4-ZTL dem Ansatz zugegeben. Als Kontrolle wurden 15.000/100 µl $HLA\text{-}A2^+$ Tumorzellen (Melanomzellen oder RCC-26) und 5.000/100 µl JB4-ZTL verwendet (Abbildung B.10). Die Inkubation erfolgte für 24 h im Brutschrank (Heraeus). Danach wurde die Platte in der Megafuge 2.0R bei 840 x g für 5 min zentrifugiert und der zellfreie Überstand in eine neue 96-well Platte überführt. Bis zur Charakterisierung des Zytokinsyntheseprofils der JB4-Zellen im Übertand mittels ELISA (Abschnitt B.13.) wurden die Platten bei -20°C gelagert.

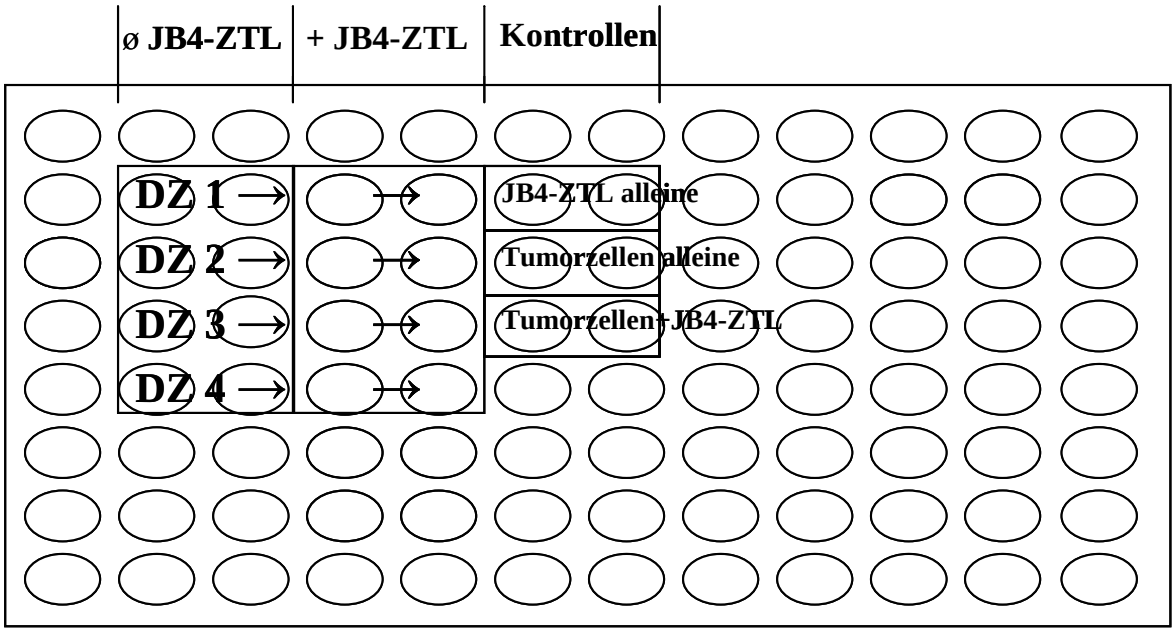


Abbildung B.10: Darstellung des Pipettierschemas für die T-Zellstimulation

DZ 1: w/o (Negativkontrolle), **DZ 2:** DZ+3oxoC_4-HSL; **DZ 3:** DZ+C_{12}-HSL; **DZ 4:** DZ+3oxoC_{12}-HSL
(ø bedeutet ohne)

B.13. Zytokinquantifizierung mittels ELISA

Der ELISA dient dem Nachweis und der Quantifizierung von Proteinen in Suspensionen. Das Prinzip besteht darin, dass die zu untersuchende Substanz über einen am Plattenboden haftenden spezifischen Capture-Antikörper gebunden und konzentriert wird. Durch Zugabe eines zweiten, gegen die Zielstruktur gerichteten biotinylierten Antikörpers und des Enzyms Streptavidin-HRP („horseradish peroxidase“) entsteht das so genannte „Antikörper-Antigen-Antikörper-Sandwich“. Da beide Antikörper an das gleiche Protein binden ist es wichtig, dass beide unterschiedliche Epitope erkennen, da sie sich sonst gegenseitig behindern würden. Anschließend wird ein adäquates Substrat zugegeben, das vom Enzym in ein farbiges Reaktionsprodukt umgesetzt wird. Als Substrat dient eine Kombination aus Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzin (TMB). Lösliches TMB wird in Gegenwart von Peroxidase und Wasserstoffperoxid zu einem blauen Chromogen umgesetzt. Nach Abstoppen der Enzymreaktion mit Phosphorsäure schlägt die Färbung der Lösung in einen gelben Farbton um. Die Intensität des Farbtons kann mittels eines ELISA Readers bei 450 nm photometrisch gemessen und quantifiziert werden. Die Signalstärke verhält sich proportional zur Zytokinkonzentration. Anhand der Standardreihe mit definierten Konzentrationen des gesuchten Zytokins kann die Konzentration des Proteins in den einzelnen Proben ermittelt werden.

Zur Charakterisierung des Zytokinsyntheseprofils der JB4-ZTL, nach Kokultivierung mit AHL-behandelten DZ, wurde ein ELISA zum spezifischen Nachweis des Proteins IFN-gamma in den zellfreien Kulturüberständen (Tabelle B.23) durchgeführt. Hierfür wurde eine 96-well Platte mit einer MaxiSorp™ Oberfläche mit einem Capture-Antikörper beschichtet. Dafür wurde eine 1:250 Verdünnung des Antikörpers in Coating-Puffer hergestellt. Anschließend wurden jeweils 50 µl einer IFN-gamma-spezifischen, unmarkierten Antikörperlösung pro Kavität zugegeben und für mindestens 12 h bei 4°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Antikörper mit Waschpuffer entfernt und unspezifische Bindungstellen mit 300 µl Blockierungspuffer für mindestens 1 h bei RT blockiert. Danach wurde die Platte gewaschen und jeweils 50 µl der Überstände von den T-Zellstimulationsversuchen bzw. der hergestellten Standardproben in Duplikaten aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurden die nicht-gebundenen Proteine durch fünfmaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Die Detektionslösung wurde erst kurz vor Anwendung vorbereitet. Hierfür wurde eine 1:250 Verdünnung des biotinylierten

Detektionsantikörpers und des Streptavidin-HRP Enzymkonjugats mit Blockierungspuffer hergestellt und dann 50 µl davon pro Kavität zugegeben. Nach 1 h Inkubationszeit erfolgten 7 Waschschritte, um überschüssiges Streptavidin-HRP Enzymkonjugat zu entfernen. Dann wurde 100 µl der Substratlösung, die erst kurz vor Gebrauch hergestellt wurde, pro Kavität zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 15 min bei RT im Dunkeln, wobei die Stärke der Farbreaktion beobachtet wurde. Durch Zugabe von je 50 µl/Kavität 1 M Phosphorsäure wurde die Reaktion beendet. Die Farbintensität des umgesetzten Produkts ist hierbei proportional zur Konzentration an Zytokin, welches im Überstand enthalten ist; dies wurde photometrisch mit Hilfe eines ELISA Readers (Tecan Group Ltd.-Sunrise™, Männedorf, Schweiz) bestimmt.

Tabelle B.23: Verwendeter Kit für den ELISA

Kit	**Firma**
OptEIA™ Human IFN-gamma ELISA Set OptEIA™ Substrate Reagent Set A + B	BD Biosciences

B.14. Statistische Auswertung

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Varianzanalysen nach Abzug des Leerwerts (Negativkontrolle) und der Normierung auf die Positivkontrolle mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism Version 5.0 (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Das Datenmaterial wurde mit einem so genannten „Omnibustest", dem Kruskal-Wallis Test nicht-parametrischen ANOVA ausgewertet, da keine Normalverteilung der gemessenen Größen (Varianzhomogenität) zu erwarten war und mehr als zwei Gruppen vorhanden waren. Dieser Test verwertet das gesamte verfügbare Datenmaterial. Als post-hoc Test folgte der Dunn´s Multiple Comparison Test. Hier wurden die verschiedenen Versuchsgruppen einzeln miteinander verglichen. Die Streuung der Messwerte wurde als Standardabweichung des Mittelwerts (Mittelwert ± Standardabweichung) angegeben. Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten $\leq 0{,}05$ angenommen und ist durch Sternchen markiert (Tabelle B.24).

Tabelle B.24: Signifikanzgrenzen der Testverfahren

p> 0,05	nicht signifikant	ns
p< 0,05	signifikant	*
p< 0,01	sehr signifikant	**
p< 0,001	höchst signifikant	***

C. ERGEBNISSE

C.1. Keimzahlbestimmung von *P. aeruginosa*

Wie im Abschnitt B.1.6. beschrieben, wurde die Zellzahl von Kulturen des *P. aeruginosa* P1E Klinikisolats mittels Verdünnungsreihen quantifiziert. Alle gewachsenen Kolonien auf den Festmedien hatten die gleiche Form und den typisch „metallisch-grünen" Glanz auf der Oberfläche. Nach der Auswertung der Platten wurden Mittelwerte in Höhe von $5{,}4 \times 10^7$ CFU/ml (± 0,6) bei einer $OD_{436\ nm}$ von 0,177 und $5{,}9 \times 10^7$ CFU/ml (± 0,2) bei einer $OD_{436\ nm}$ von 0,188 (CFU/ml bei einer $OD_{436\ nm}$ von 1,0 ≙ $3{,}0 \times 10^8$) ermittelt. Durch mikroskopische Auszählungen wurden diese Werte verifiziert.

C.2. Bestimmung der AHL-Bioaktivität

Um zu überprüfen, ob die AHL nach dem Herstellen der AHL-Aliquots (Abschnitt B.2.1.) noch über Bioaktivität verfügen, wurden AHL-Biotests mit dem AHL-Rezeptorstamm *P. putida* F117 pKR-C12 (Abschnitt B.2.2.) durchgeführt. Bei allen getesteten AHL (Tabelle B.3) in den Konzentrationen 1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml konnte eine GFP-Fluoreszenz unter dem Stereomikroskop (Abschnitt B.11.4.) gesehen werden. Somit lagen alle AHL in ihrer aktiven Lacton-Struktur vor.

C.3. Ermittlung einer geeigneten AHL- und LPS-Konzentration für die Reifung der DZ

Ziel der Versuche war, eine geeignete AHL- und LPS-Konzentration zu bestimmen, bei der toxische Effekte von 3oxoC_{12}-HSL auf die DZ auszuschließen und bei LPS ausreichende Mengen vorhanden waren, um die Reifung der DZ einzuleiten (Abschnitt B.6.). DMSO, welches als Lösungsmittel der AHL diente, wurde als Kontrolle mitgeführt. Hierfür wurden mehrere Versuche mit unterschiedlicher Versuchsanordnung durchgeführt, wobei in der vorliegenden Arbeit nur ein Teil der Experimente dargestellt ist. Dazu wurden

die unreifen DZ mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 30 µM, 60 µM und 100 µM) der AHL (Tabelle B.3), DMSO (100 µM) plus dem Reifungsfaktor LPS (0,05 µg/ml bzw. 0,1 µg/ml) stimuliert (Abschnitt B.3.18.) und mittels Durchflusszytometrie die Expression der Marker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR bestimmt. Die Kultivierung der DZ mit LPS alleine stellt in allen Versuchen die Positivkontrolle (100%) dar, worauf die untersuchten Oberflächenmarker normiert wurden.
Durchflusszytometrische Untersuchungen (Abbildung C.1) zeigten, dass eine Zugabe von 0,05 µg/ml LPS und 100 µM 3oxoC_4-HSL keinen Einfluss auf die getesteten Oberflächenmarker der DZ hatte, während die Zugabe von 0,05 µg/ml LPS und 100 µM 3oxoC_{12}-HSL die Expression der spezifischen Moleküle unterdrückte.
Bei Anwendung aufsteigender Konzentrationen (Abbildung C.2) von 3oxoC_{12}-HSL (0,1-100 µM) zeigte sich eine für den jeweiligen Oberflächenmarker spezifische „Konzentrationsabhängigkeit“. In Gegenwart von 100 µM 3oxoC_{12}-HSL wurde keiner der getesteten Oberflächenmarker exprimiert, während eine Konzentration von 10 µM zu einer inhibierten Expression von CD83, CD80 und CD40 führten. Eine Stimulation mit 0,05 µg/ml LPS und 100 µM C_{12}-HSL wirkte gleichfalls inhibierend auf die Expression der getesteten Marker.
In Abbildung C.3 wurde 3oxoC_{12}-HSL in den Konzentrationen 10 µM, 30 µM, 60 µM und 100 µM getestet. Es wurde die doppelte Dosis an LPS (0,1 µg/ml) verwendet. Mit dem stärkeren Reifungsstimulus war der inhibierende Einfluss von 3oxoC_{12}-HSL auf die Induktion der Markerexpression schwächer. Alle Marker zeigten auch beim Einsatz von 100 µM 3oxoC_{12}-HSL noch eine deutliche Expression, auch wenn sie nur z.T. die Hälfte der LPS-Kontrolle erreichten. Ohne LPS führte die Behandlung mit 3oxoC_{12}-HSL zu einer Induktion des Moleküls CD86 (75%), vergleichbar mit der Kontrolle, beeinflusste aber die anderen Marker nicht. Das Lösungsmittel DMSO zeigte in der getesteten Konzentration (100 µM) keine negativen Effekte auf die humanen Zellen (Daten sind in der vorliegenden Arbeit nicht dargestellt). Die Oberflächenmarker exprimierenden DZ waren mit der Negativkontrolle zu vergleichen.

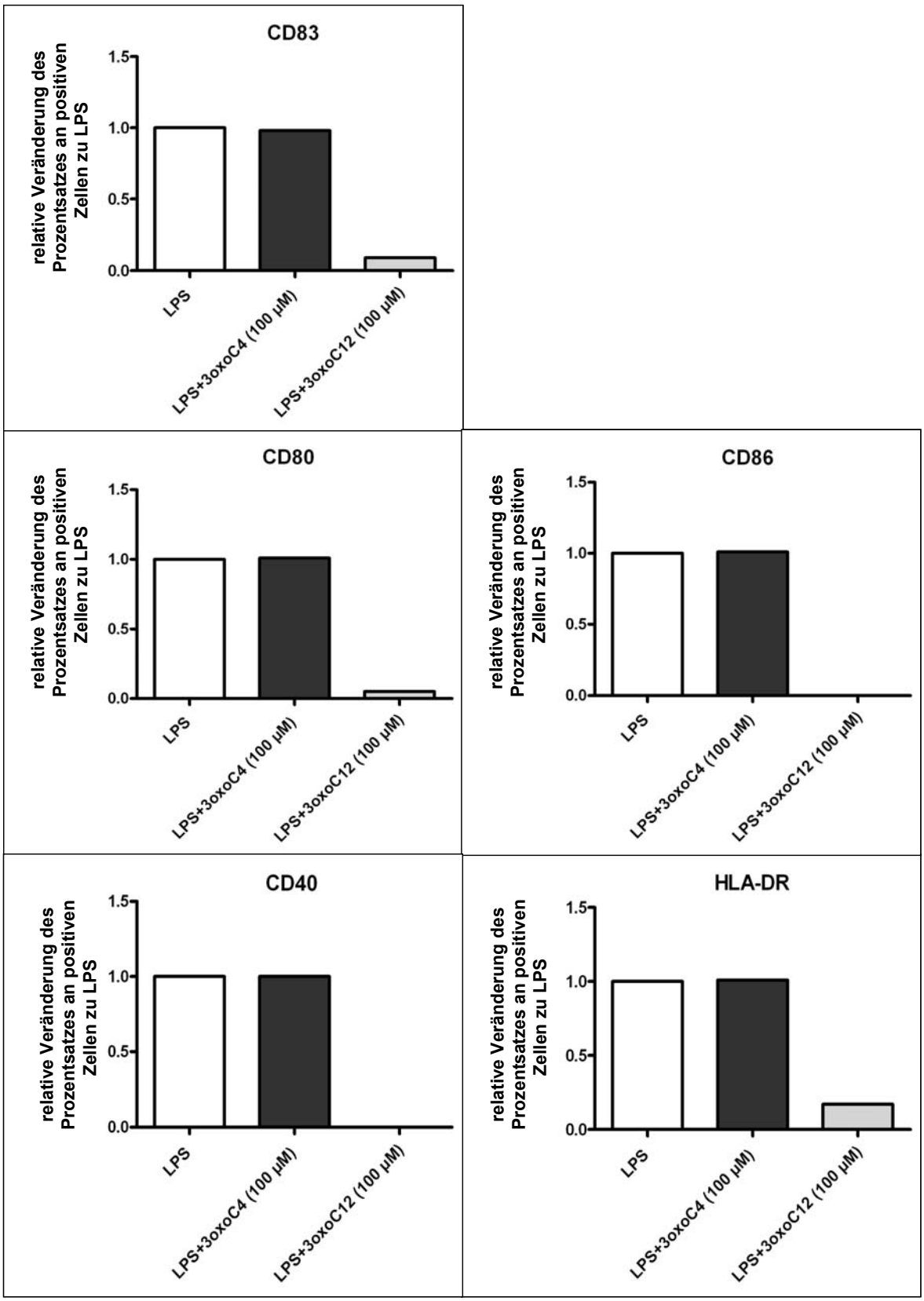


Abbildung C.1: **Expression der Maturationsmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR** (% relativ zu LPS=100%) **nach der Stimulation der DZ mit 0,05 µg/ml LPS und den AHL in der Konzentration 100 µM** (n=1).

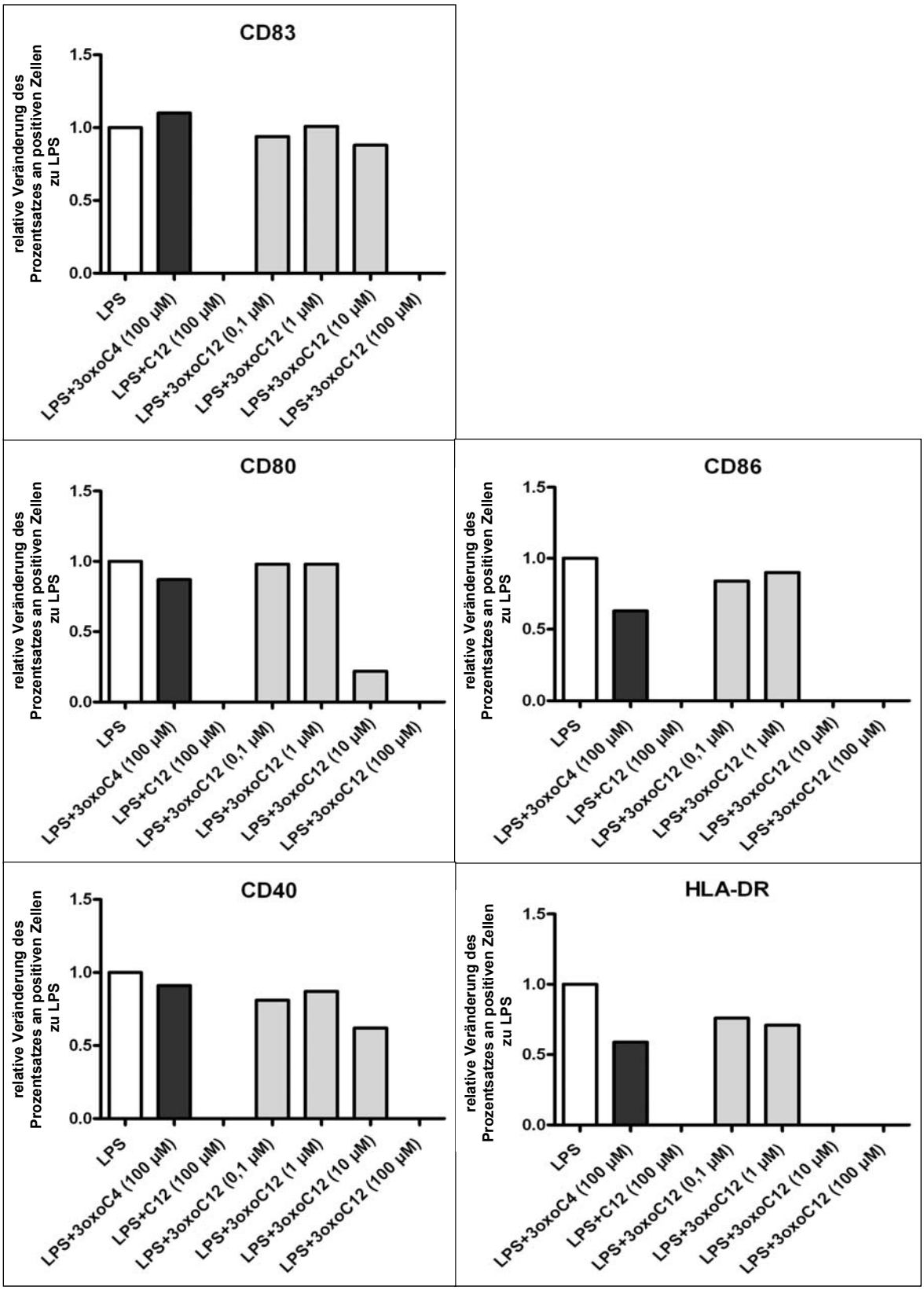


Abbildung C.2: **Expression der Maturationsmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR** (% relativ zu LPS=100%) **nach der Stimulation der DZ mit 0,05 µg/ml LPS und den AHL in den Konzentrationen 0,1 µM, 1 µM, 10 µM und 100 µM** (n=1).

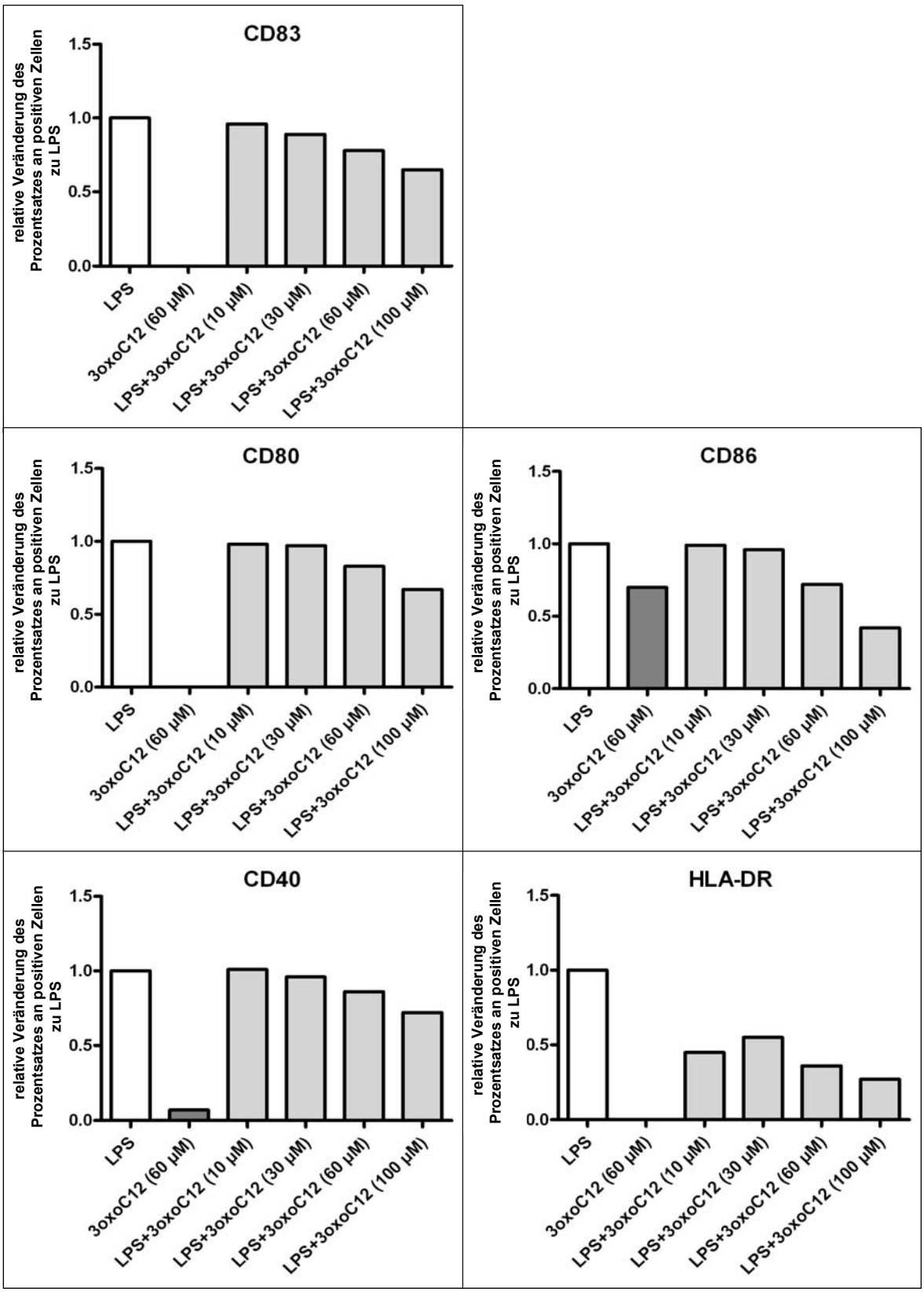


Abbildung C.3: **Expression der Maturationsmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR** (% relativ zu LPS=100%) **nach der Stimulation der DZ ohne bzw. mit 0,1 µg/ml LPS und den AHL in den Konzentrationen 10 µM, 30 µM, 60 µM, 100 µM** (n=1).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine größere Konzentration an LPS zu einem höheren Reifegrad der Zelle führte, d.h. prozentual waren mehr Zellen für die untersuchten Oberflächenmarker positiv und somit musste eine höhere Konzentration der AHL eingesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Ergebnisse der Versuche, sowie Literaturberichte als Orientierung verwendet (Telford, G. *et al.* 1998; Wagner, C. *et al.* 2007). Deshalb wurden alle weiteren Versuche mit 60 µM AHL und 0,1 µg/ml LPS durchgeführt.

C.4. Vitalität der DZ unter Einfluss von AHL

Um den Wirkmechanismus der AHL auf die Funktionen der DZ weiter zu definieren, wurde neben LPS mit Jonuleit Cocktail ein zusätzliches Reifungssystem verwendet, welches über andere Signalwege die DZ aktiviert. JC aktiviert die DZ über Zytokinsignalwege, während LPS über TLR-Signalwege aktiviert (Abschnitt A.3.4.1.).

Um toxische Effekte der AHL bei einer Konzentration von 60 µM auf die DZ auszuschließen, wurden Vitalitätstests durchgeführt. Dafür wurden unreife DZ ohne bzw. mit JC und den AHL stimuliert. Mit Hilfe des CellTiter-Blue®-Reagenz wurden die Zellen photometrisch auf ihre Lebensfähigkeit hin untersucht (Abschnitt B.7.).
Bei der Auswertung wurde auf die Negativkontrolle (w/o)=100%, welches die unbehandelten DZ sind, genormt. Die Versuchsgruppen wurden mit dem Dunn´s Multiple Comparison Test verglichen (Abschnitt B.14.). Dabei zeigte sich keine Einschränkung der Lebensfähigkeit der DZ, welche ohne bzw. mit JC und den AHL stimuliert wurden (Abbildung C.4).
Zusätzlich wurden die humanen Zellen in den folgenden Experimenten sporadisch mit Propidiumjodid gefärbt. Dabei zeigte sich auch bei LPS-stimulierten DZ in Anwesenheit von 60 µM AHL keine toxischen Effekte.

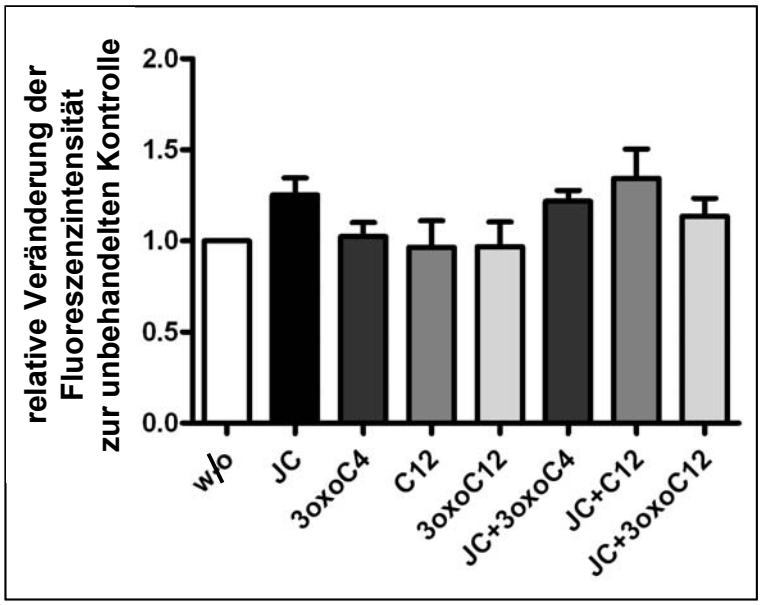


Abbildung C.4: **Vitalität der DZ, dargestellt anhand der Fluoreszenzintensität** (relativ zur unbehandelten Kontrolle w/o=100%) **nach der Stimulation der DZ ohne bzw. mit Jonuleit Cocktail (JC) und den AHL in der Konzentration 60 µM.** Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert dar (n=3; Dunn´s Multiple Comparison Test).

C.5. Einfluss von AHL auf Oberflächenmarker exprimierende DZ

Um die Auswirkung von 3oxoC_{12}-HSL *in vitro* auf die Expression von Maturations- und Migrationsmarker zu untersuchen und somit Rückschlüsse auf den Differenzierungs- und Aktivierungsgrad der DZ zu ziehen, wurden unreife DZ ohne bzw. mit JC bzw. LPS sowie den jeweiligen AHL stimuliert (Abschnitt B.3.18.). Als Kontrolle für Oxo-Substitution bzw. Seitenkettenlänge dienten die Signalmoleküle 3oxoC_4-HSL und C_{12}-HSL. Die Ansätze ohne JC bzw. LPS, in denen die DZ nur mit den AHL inkubiert wurden, entsprechen den Kontrollen. Nach der Inkubation wurden die DZ geerntet und die Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40, CD184, CD197 und HLA-DR analysiert (Abschnitt B.4. und B.5.1.). Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse sind relativ zur jeweiligen Positivkontrolle (100%) gezeigt.

Es wurde jeweils der Prozentsatz der positiven Zellen (Abschnitt C.5.1.1. und C.5.2.1.) ausgewertet sowie die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) (Abschnitt C.5.1.2. und C.5.2.2.). Mit der Bestimmung der MFI konnte eine genauere Aussage über die Dichte eines jeweiligen exprimierten Moleküls auf der Oberfläche der Zelle gemacht werden.

C.5.1. Stimulation der DZ mit JC und AHL

C.5.1.1. Prozentsatz der Oberflächenmarker exprimierenden DZ

Bei der Stimulation mit JC und 3oxoC_4-HSL waren prozentual weniger $CD83^+$ (90%), $CD80^+$ (90%), $CD86^+$ (75%) und $HLA\text{-}DR^+$ (60%) Zellen in den Proben vorhanden, als in der Positivkontrolle. $CD40^+$ (125%), $CD184^+$ (110%) und $CD197^+$ Zellen (210%) waren prozentual in höherem Umfang in den Proben zu detektieren, verglichen zur Kontrolle (Abbildung C.5).

Die Behandlung der humanen Zellen mit JC und C_{12}-HSL führte zu einem hohen Prozentsatz positiver Zellen (≥ 100%) für alle getesteten Moleküle (für CD40 liegen keine Werte vor), mit Ausnahme von CD86 (85%). Für den Reifungsmarker CD83 waren von den JC- und C_{12}-HSL-stimulierten Zellen (125%) signifikant ($p< 0,05$) mehr positiv als mit JC und 3oxoC_{12}-HSL inkubierte Zellen.

Der Prozentsatz für $CD83^+$ Zellen lag in Gegenwart von JC und 3oxoC_{12}-HSL bei 90%. Auch die Maturationsmarker CD80 (75%), CD86 (50%) und HLA-DR (50%) wurden bei der Inkubation mit JC und 3oxoC_{12}-HSL prozentual von weniger Zellen exprimiert. Der Oberflächenmarker CD40 (100%) wurde nicht herabreguliert. Während für den Migrationsmarker CD197 sogar 5mal so viele Zellen positiv waren.

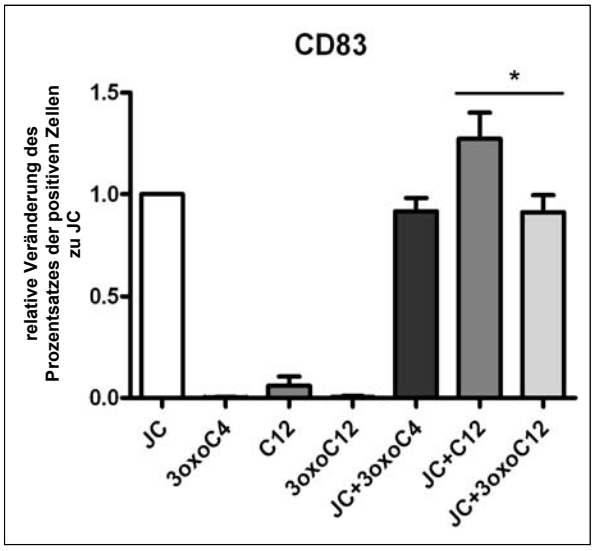


Abbildung C.5: Fortsetzung und Legende siehe nächste Seite

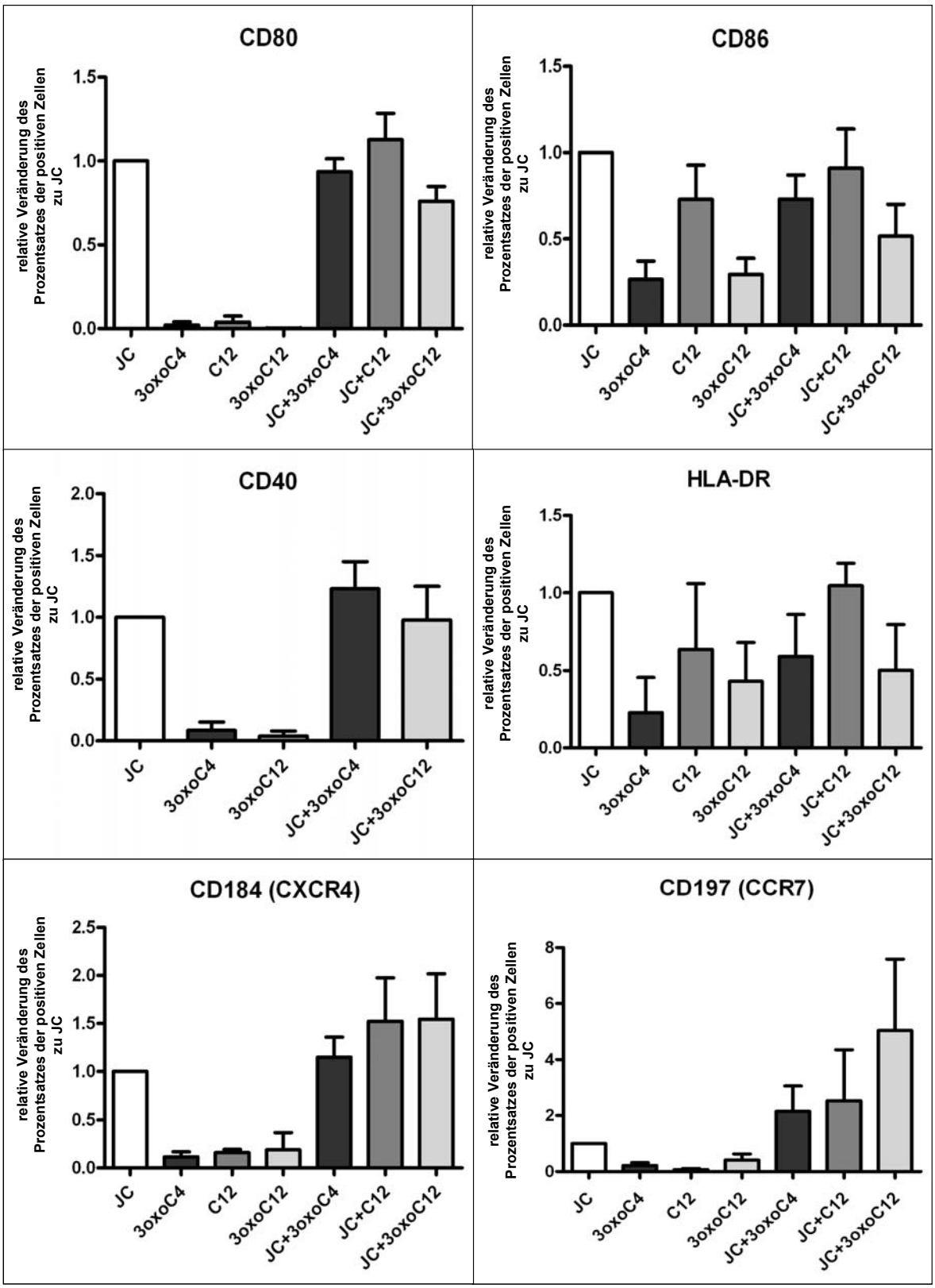


Abbildung C.5 (Fortsetzung von voriger Seite): **Expression der Maturationsmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR und der Migrationsmarker CD184 und CD197** (% relativ zu Jonuleit Cocktail JC=100%) **nach der Stimulation der DZ ohne bzw. mit JC und den AHL in der Konzentration 60 µM.** Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert dar (CD83/CD80/CD86 n=7, CD40 n=3, HLA-DR/CD184 n=4, CD197 n= 5, abweichend sind für C_{12}-HSL und JC+C_{12}-HSL jeweils nur n=3 Experimente dargestellt; Dunn´s Multiple Comparison Test, * $p < 0,05$).

C.5.1.2. MFI der Oberflächenmarker exprimierenden DZ

Bei der Stimulation mit JC und 3oxoC$_4$-HSL lag die MFI der exprimierten Maturations- und Migrationsmarker der humanen Zellen meist im Bereich der Positivkontrolle (Abbildung C.6). Die Ausnahmen bildeten CD86$^+$ Zellen mit einer MFI von ≥ 85% und CD197$^+$ Zellen mit einer MFI von 75%.

Bei Zellen, welche mit JC und C$_{12}$-HSL inkubiert wurden, war die MFI meist höher als bei der Positivkontrolle (100%).

In Anwesenheit von JC und 3oxoC$_{12}$-HSL in der *in vitro* Kultur, war die Expression des Oberflächenmarkers CD80 (85%) signifikant verringert; auch die Marker CD86 (75%) und HLA-DR (75%) waren vermindert zu detektieren.

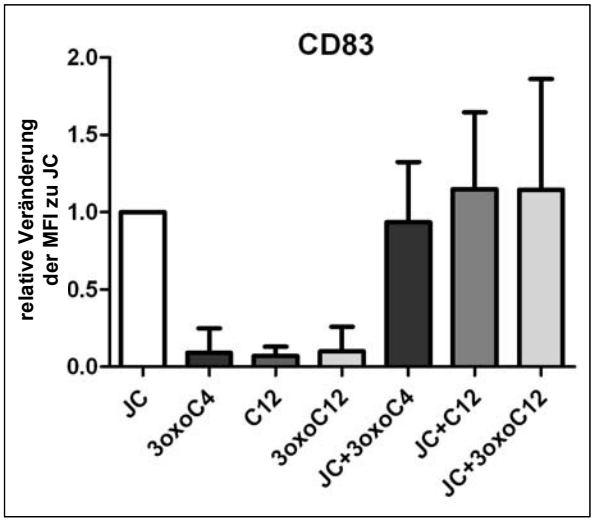


Abbildung C.6: Fortsetzung und Legende siehe nächste Seite

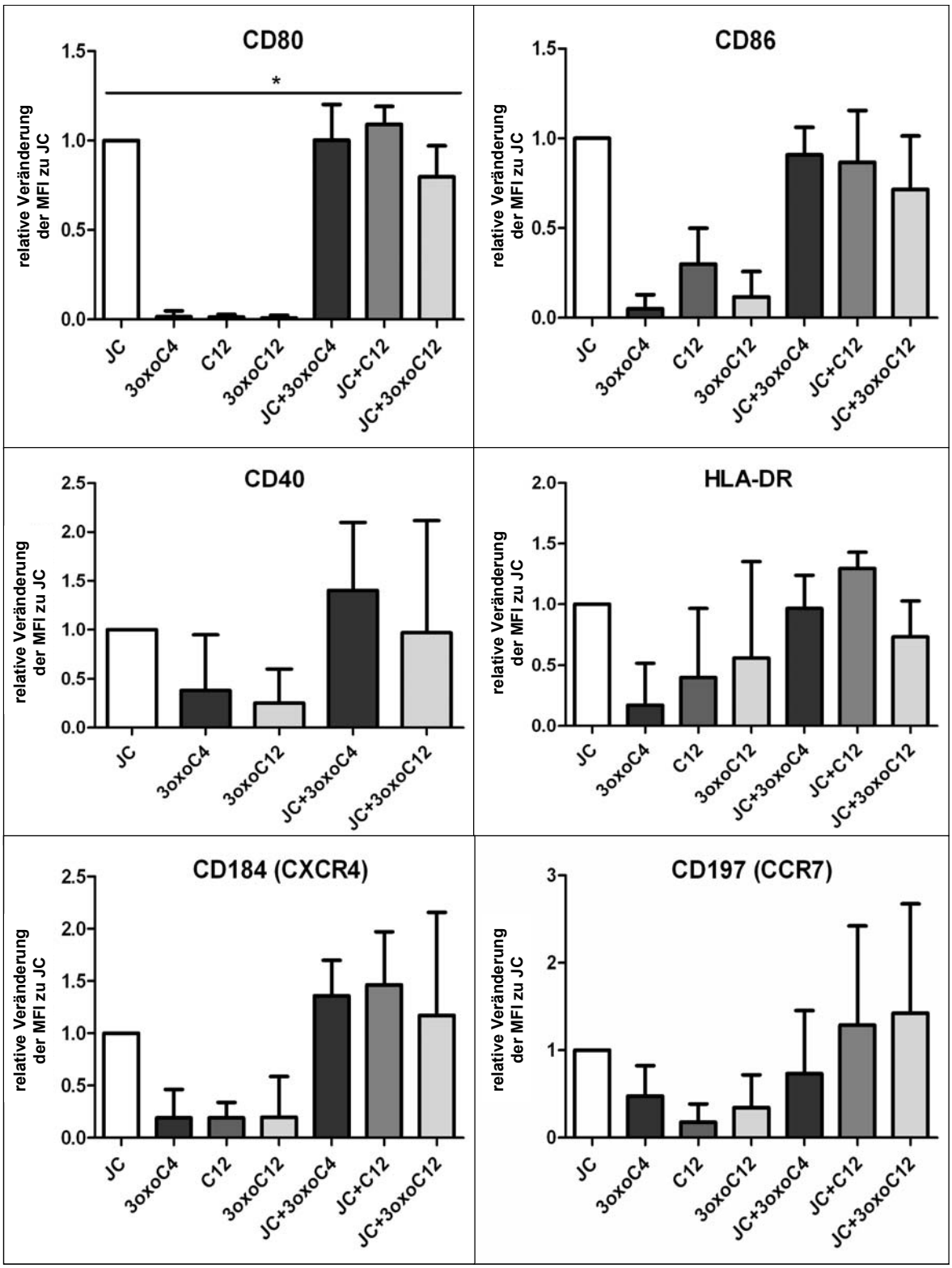


Abbildung C.6 (Fortsetzung von voriger Seite): **Expression der Maturationsmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR und der Migrationsmarker CD184 und CD197** (MFI relativ zu Jonuleit Cocktail JC=100%) **nach der Stimulation der DZ ohne bzw. mit JC und den AHL in der Konzentration 60 µM.** Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert dar (CD83/CD80/CD86 n=7, CD40 n=3, HLA-DR/CD184 n=4, CD197 n= 5, abweichend sind für C_{12}-HSL und JC + C_{12}-HSL jeweils nur n=3 Experimente dargestellt; Dunn´s Multiple Comparison Test,* $p< 0,05$).

C.5.1.3. Vergleich des Prozentsatzes und der MFI der DZ

Wird der Prozentsatz der Zellen, welche positiv für ein jeweiliges Oberflächenmolekül waren und die MFI dieser Zellen miteinander und der jeweiligen Positivkontrolle verglichen, treten zum Teil Unterschiede auf (Abbildung C.5 und C.6).

Die Behandlung der DZ mit JC und 3oxoC_4-HSL führte prozentual zu weniger positiven Zellen für das Molekül HLA-DR (60%) (Abbildung C.5). Die MFI dieser Zellen war hingegen mit der MFI der Positivkontrolle auf demselben Niveau (Abbildung C.6), d.h. die Dichte der Moleküle auf der Zelloberfläche änderte sich durch 3oxoC_4-HSL nicht. Es kam durch die Anwesenheit von 3oxoC_4-HSL prozentual zu mehr Zellen, die keine HLA-DR Marker exprimierten.

Die Stimulation mit JC und C_{12}-HSL führte dagegen bei dem Molekül CD197 zu großen Unterschieden zwischen dem Prozentsatz der positiven Zellen (250%) und der MFI (130%) dieser Zellen. Hier war die Expressionsdichte des Moleküls auf den Zellen niedriger, als der Prozentsatz der $CD197^+$ Zellen.

Bezüglich der Maturationsmarker CD83, CD86 und HLA-DR nahm die Anzahl der exprimierenden Zellen in Gegenwart von JC und 3oxoC_{12}-HSL im Vergleich zur Kontrolle deutlich ab. Die MFI der Zellen für diese Marker war weniger reduziert. Bei den Migrationsmarkern CD184 (150%) und CD197 (500%) nahm der prozentuale Anteil an positiven Zellen jedoch in Anwesenheit von 3oxoC_{12}-HSL deutlich zu, während die MFI der Zellen nur gering zunahm (115% und 150%).

C.5.2. Stimulation der DZ mit LPS und AHL

C.5.2.1. Prozentsatz der Oberflächenmarker exprimierenden DZ

Unter Einwirkung von LPS und 3oxoC_4-HSL (Abbildung C.7) waren prozentual nahezu alle Zellen (75-100%) für die jeweiligen Oberflächenmarker positiv, mit Ausnahme von $CD197^+$ DZ (45%).

Bei den Zellen, welche mit LPS und C_{12}-HSL behandelt wurden, war ein niedrigerer Prozentsatz an positiven Zellen für die jeweiligen Oberflächenmarker zu detektieren. Eine signifikante Abnahme von $CD83^+$ Zellen ($p< 0,01$) mit 25% war ebenso zu beobachten.

CD40 wurde nur von 30% der Zellen exprimiert, während 50% der Zellen für CD197 positiv waren. Dagegen waren $CD80^+$ (95%), $CD86^+$ (90%) und HLA-DR^+ (90%) markierte Zellen, nach LPS- und C_{12}-HSL-Stimulierung nur wenig reduziert.

Bei Kultivierung der DZ mit LPS und 3oxoC_{12}-HSL waren die für die Maturationsmarker CD83 ($p< 0{,}001$), CD80 ($p< 0{,}001$), CD86 ($p< 0{,}001$) und HLA-DR positive Zellen ($p< 0{,}001$) jedoch signifikant weniger. Der Vergleich zwischen den $CD83^+$ ($p< 0{,}05$), $CD80^+$ ($p< 0{,}001$) und $CD86^+$ Zellen ($p< 0{,}05$), welche mit LPS und 3oxoC_4-HSL kultiviert wurden und denen, welche mit LPS und 3oxoC_{12}-HSL stimuliert wurden, führte gleichfalls zu signifikanten Ergebnissen. Des Weiteren kam es zu einer Abnahme von 50-60% der CD40 und CD184 positiv getesteten Zellen bei einer Kultivierung mit LPS und 3oxoC_{12}-HSL. Der Anteil der $CD197^+$ Zellen lag sogar nur bei 25%.

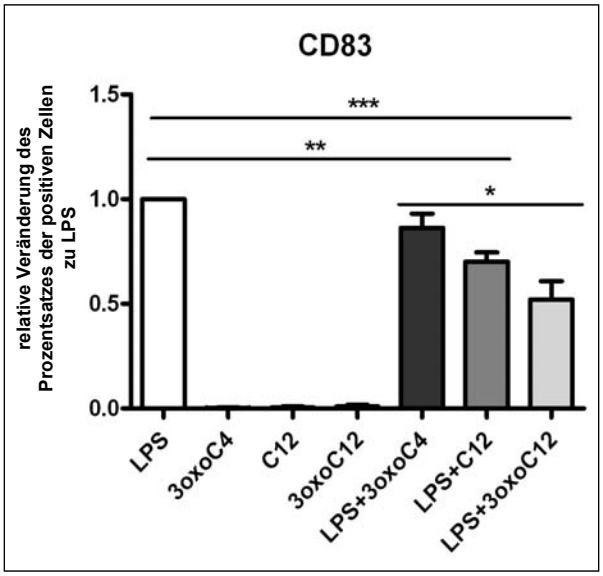


Abbildung C.7: Fortsetzung und Legende siehe nächste Seite

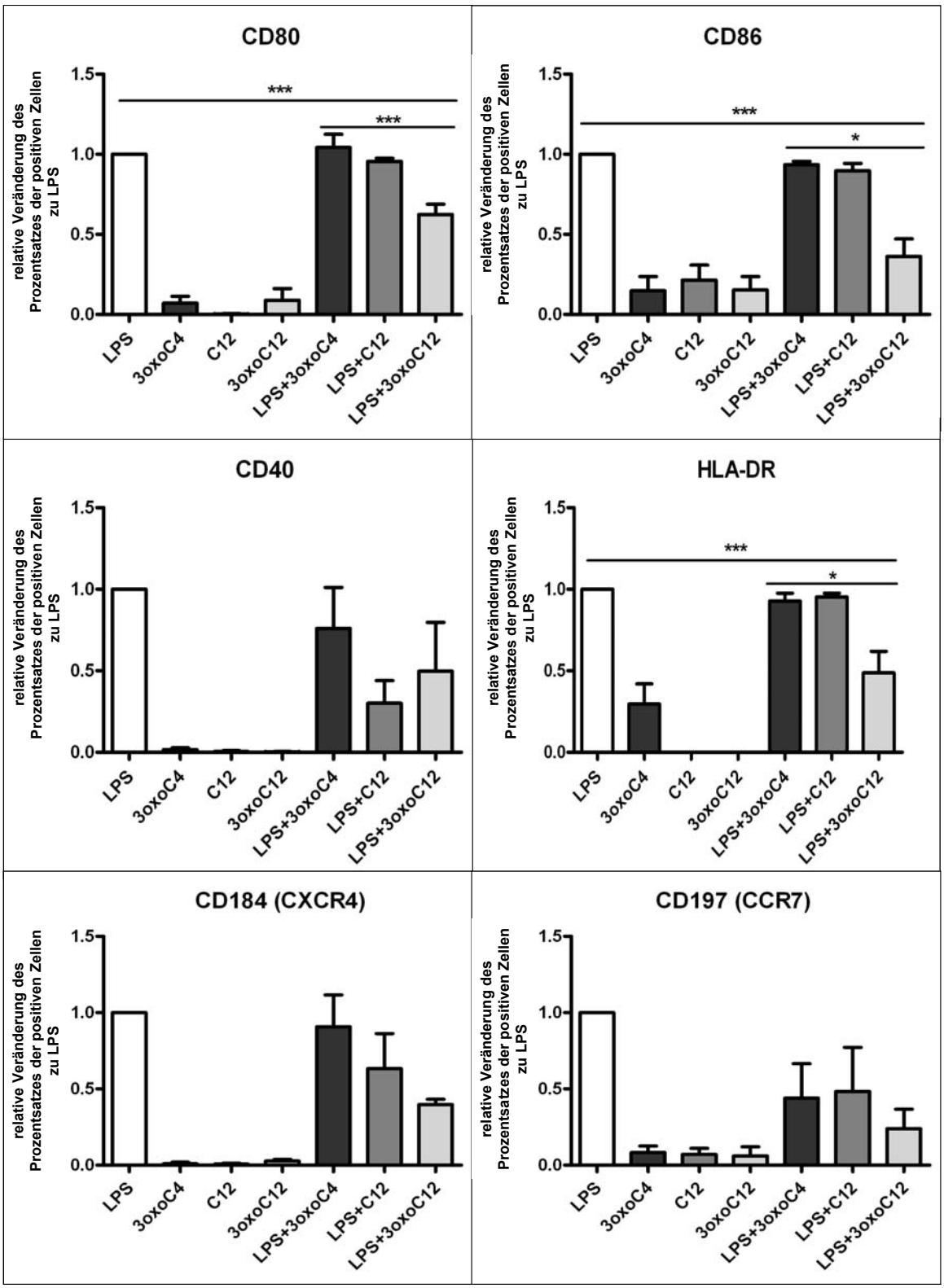


Abbildung C.7 (Fortsetzung von voriger Seite): **Expression der Maturationsmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR und der Migrationsmarker CD184 und CD197** (% relativ zu LPS=100%) **nach der Stimulation der DZ ohne bzw. mit LPS und den AHL in der Konzentration 60 µM.** Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert dar (CD83/CD80/CD86 n=9, CD40 n=4, HLA-DR n=7, CD184/CD197 n=3, abweichend sind für C_{12}-HSL und LPS + C_{12}-HSL jeweils nur n=3 Experimente dargestellt; Dunn´s Multiple Comparison Test, * $p< 0,05$, ** $p< 0,01$, *** $p< 0,001$).

C.5.2.2. MFI der Oberflächenmarker exprimierenden DZ

Die Stimulation mit LPS und 3oxoC_4-HSL (Abbildung C.8) führte nur für den Chemokinrezeptor CD197 (40%) zu einer stark verminderten Expression.

DZ, welche mit LPS und C_{12}-HSL stimuliert wurden, exprimierten alle getesteten Moleküle (mit Ausnahme von HLA-DR) in einer geringeren Zahl auf ihrer Oberfläche (25-80%). Ein signifikanter Unterschied ($p< 0{,}001$, $p< 0{,}05$) war zwischen den Zellen, welche den Reifemarker CD83 und das kostimulatorische Molekül CD86 exprimierten und der Positivkontrolle zu dokumentieren.

Bei der Kultivierung der DZ mit LPS und 3oxoC_{12}-HSL war ebenfalls eine große Abnahme der Oberflächenmarker auf den Zellen zu beobachten. Die Dichte an CD83 (55%, $p< 0{,}001$), CD80 (55%, $p< 0{,}01$) und CD86 (60%, $p< 0{,}001$) Molekülen auf der Zelloberfläche unterschied sich signifikant von der Expressionsstärke der DZ, welche nur mit LPS behandelt wurden. Ebenfalls signifikant ($p< 0{,}01$, $p< 0{,}05$) war der Unterschied bei $CD80^+$ und $HLA\text{-}DR^+$ Zellen zwischen der MFI der DZ, welche mit LPS und 3oxoC_4-HSL inkubiert wurden und der MFI der Zellen, welche mit LPS und 3oxoC_{12}-HSL stimuliert wurden.

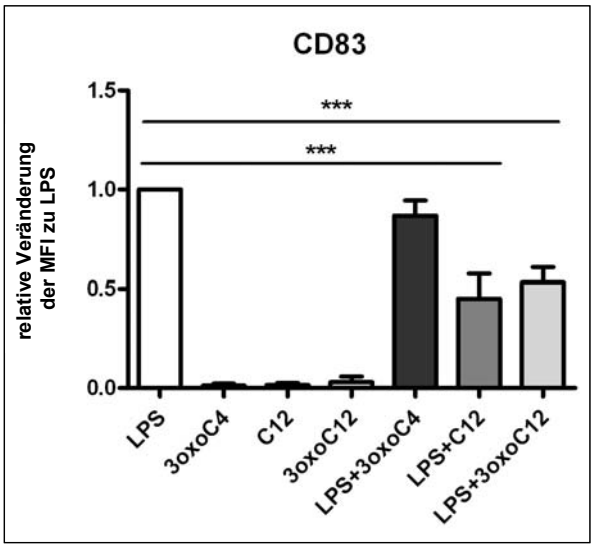


Abbildung C.8: Fortsetzung und Legende siehe nächste Seite

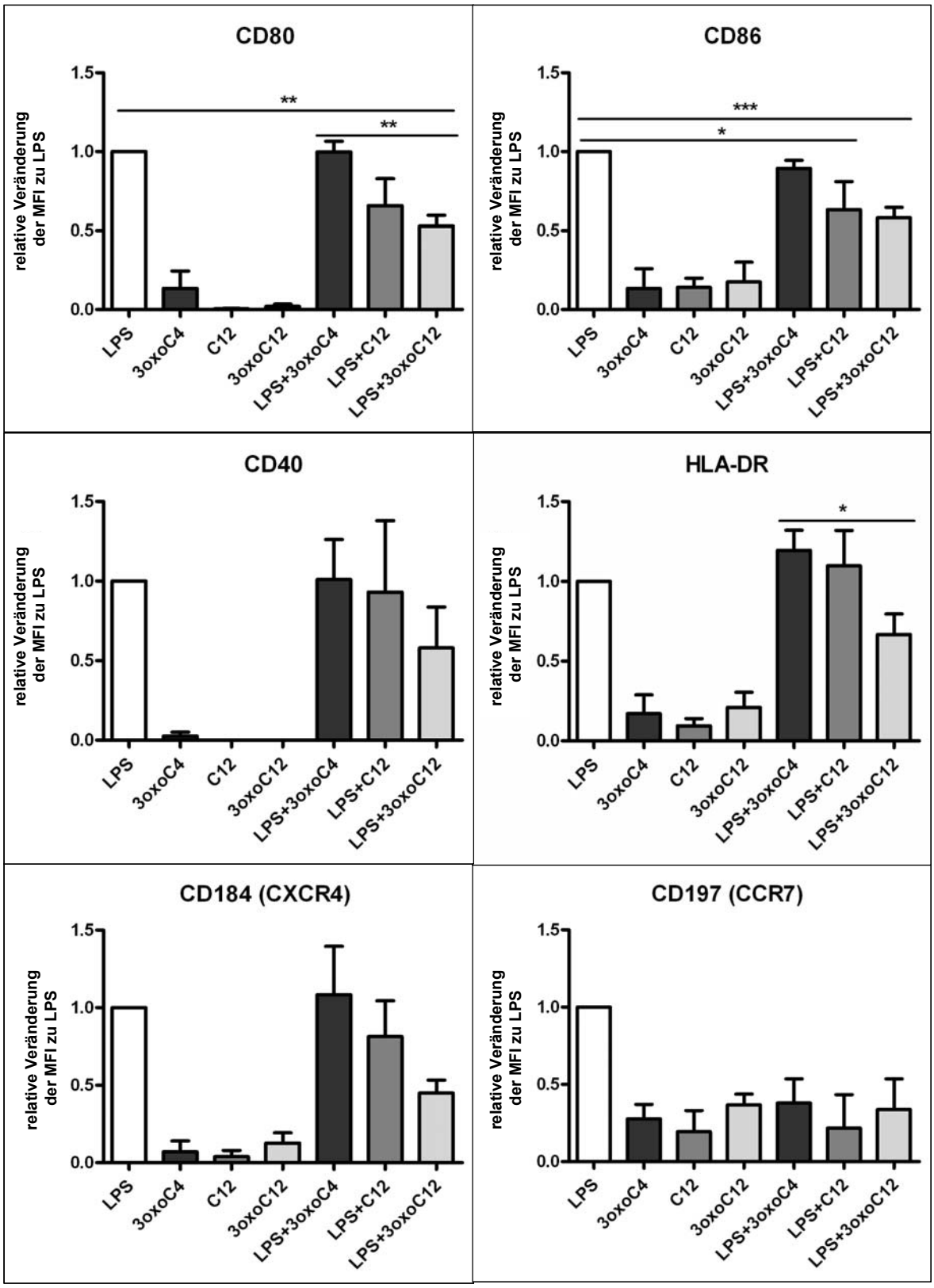


Abbildung C.8 (Fortsetzung von voriger Seite): **Expression der Maturationsmarker CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR und der Migrationsmarker CD184 und CD197** (MFI relativ zu LPS=100%) **nach der Stimulation der DZ ohne bzw. mit LPS und den AHL in der Konzentration 60 µM.** Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert dar (CD83/CD80/CD86 n=9, CD40 n=4, HLA-DR n=7, CD184/CD197 n=3, abweichend sind für C_{12}-HSL und LPS + C_{12}-HSL jeweils nur n=3 Experimente dargestellt; Dunn´s Multiple Comparison Test, * $p< 0,05$, ** $p< 0,01$, *** $p< 0,001$).

C.5.2.3. Vergleich des Prozentsatzes und der MFI der DZ

$CD83^+$, $CD80^+$ und $CD86^+$ DZ, welche mit LPS und $3oxoC_4$-HSL stimuliert wurden, waren sowohl bezüglich des Prozentsatzes an positiven Zellen (Abbildung C.7) und ihrer MFI auf dem Niveau der Kontrolle (Abbildung C.8). Der Prozentsatz der für die Moleküle CD40 (75%), HLA-DR (90%) und CD184 (85%) positiven Zellen hatte in etwa eine MFI vergleichbar zur Positivkontrolle (100-120%).

Bei der Stimulation von DZ mit LPS und C_{12}-HSL kam es ebenfalls zu einer Verminderung der Moleküldichte auf der Oberfläche der Zellen. Während 50-100% der Zellen CD83, CD80, CD86 und CD197 positiv für das jeweilige Molekül waren, war die MFI (25-70%) dieser Zellen wesentlich vermindert. Im Gegensatz dazu war bei $CD40^+$ (30%) DZ die MFI der Zellen mit 90% fast unverändert.

Die MFI der mit LPS und $3oxoC_{12}$-HSL kultivierten $CD86^+$, $CD40^+$ und HLA-DR^+ DZ war höher als der Prozentsatz der positiven Zellen für die jeweiligen Oberflächenmarker. Das bedeutet, dass einige Zellen Maturationmarker und MHC Klasse II-Strukturen exprimierten, diese aber in einem geringeren Umfang auf der Zelloberfläche vorkamen. Für das Molekül CD80 galt das Umgekehrte; hier war die MFI niedriger, als der Prozentsatz der positiven DZ.

C.5.3. Zusammenfassung des Einflusses von AHL auf die Stimulation der DZ

Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von $3oxoC_4$-HSL bei gleichzeitiger Stimulation mit JC- bzw. LPS keine nennenswerten Effekte auf den Prozentsatz der Oberflächenmarker exprimierenden DZ hatte. Eine Ausnahme waren die $CD86^+$ und HLA-DR^+ Zellen bei der Stimulation mit JC und $CD40^+$ und $CD197^+$ Zellen bei der Stimulation mit LPS (Abbildung C.5 und C.7).

Durch C_{12}-HSL war bei der Kultivierung der DZ mit LPS, nicht aber JC, die Expression der Marker CD83, CD40, CD184 und CD197 prozentual herabreguliert.

Bei der Stimulation der DZ mit LPS und $3oxoC_{12}$-HSL wurden insgesamt prozentual mehr Oberflächenmarker signifikant herabreguliert als bei der Stimulation mit JC und $3oxoC_{12}$-HSL. Bei beiden Stimulationsansätzen waren die $CD83^+$, $CD80^+$, $CD86^+$ und HLA-DR^+

Zellen vermindert zu detektieren. Bei LPS- und 3oxoC_{12}-HSL-stimulierten DZ kam es zudem zu einer Minderexpression von CD40, CD184 und CD197 Molekülen auf der Zelloberfläche. Somit führte eine Kultivierung der DZ mit LPS und 3oxoC_{12}-HSL bei allen untersuchten Molekülen zu einer teilweise drastischen Reduktion des Prozentsatzes der Oberflächenmarker exprimierenden Zellen.

C.6. Einfluss von AHL auf die Expression von MHC Klasse I-Molekülen und einem Adhäsionsmolekül bei DZ

Um die Auswirkungen der AHL auf die Expression der MHC Klasse I-Moleküle (HLA-A2 und HLA-ABC) und auf das Adhäsionsmolekül ICAM-1 (CD54) auf der Zelloberfläche der DZ zu testen, wurden die generierten Zellen (Abschnitt B.3.17.4.) ohne Stimulation mit JC oder LPS und mit verschiedenen AHL inkubiert. Exemplarisch ist ein Versuch aus insgesamt dreien gezeigt, da das Ergebnis bei allen Experimenten absolut reproduzierbar war. Abbildung C.9 zeigt als Beispiel die Nierenzellkarzinomlinie RCC-26, welche sowohl für die MHC Klasse I-Moleküle, als auch für ICAM-1 positiv ist und als positive Kontrollzelllinie verwendet wurde.

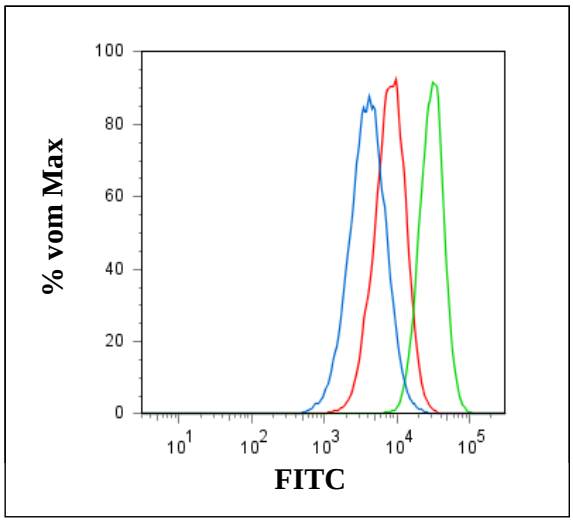


Abbildung C.9: **Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1, sowie HLA-A2 und HLA-ABC der Nierenzellkarzinomlinie RCC-26** (y-Achse: % vom Maximum, x-Achse: FITC).

Blau: ICAM-1, **Rot:** HLA-A2, **Grün:** HLA-ABC

In Abbildung C.10 sind die Histogramme der Marker HLA-A2, HLA-ABC und ICAM-1 bei DZ dargestellt. Die unbehandelten DZ (Negativkontrolle) sind rot, mit 3oxoC_4-HSL stimulierte DZ grün, mit C_{12}-HSL stimulierte DZ blau und mit 3oxoC_{12}-HSL stimulierte DZ braun dargestellt.

Wie deutlich erkennbar, veränderte sich durch die Inkubation der DZ (ohne JC- bzw. LPS-Stimulierung) mit den jeweiligen AHL das Expressionsprofil der Marker nicht.

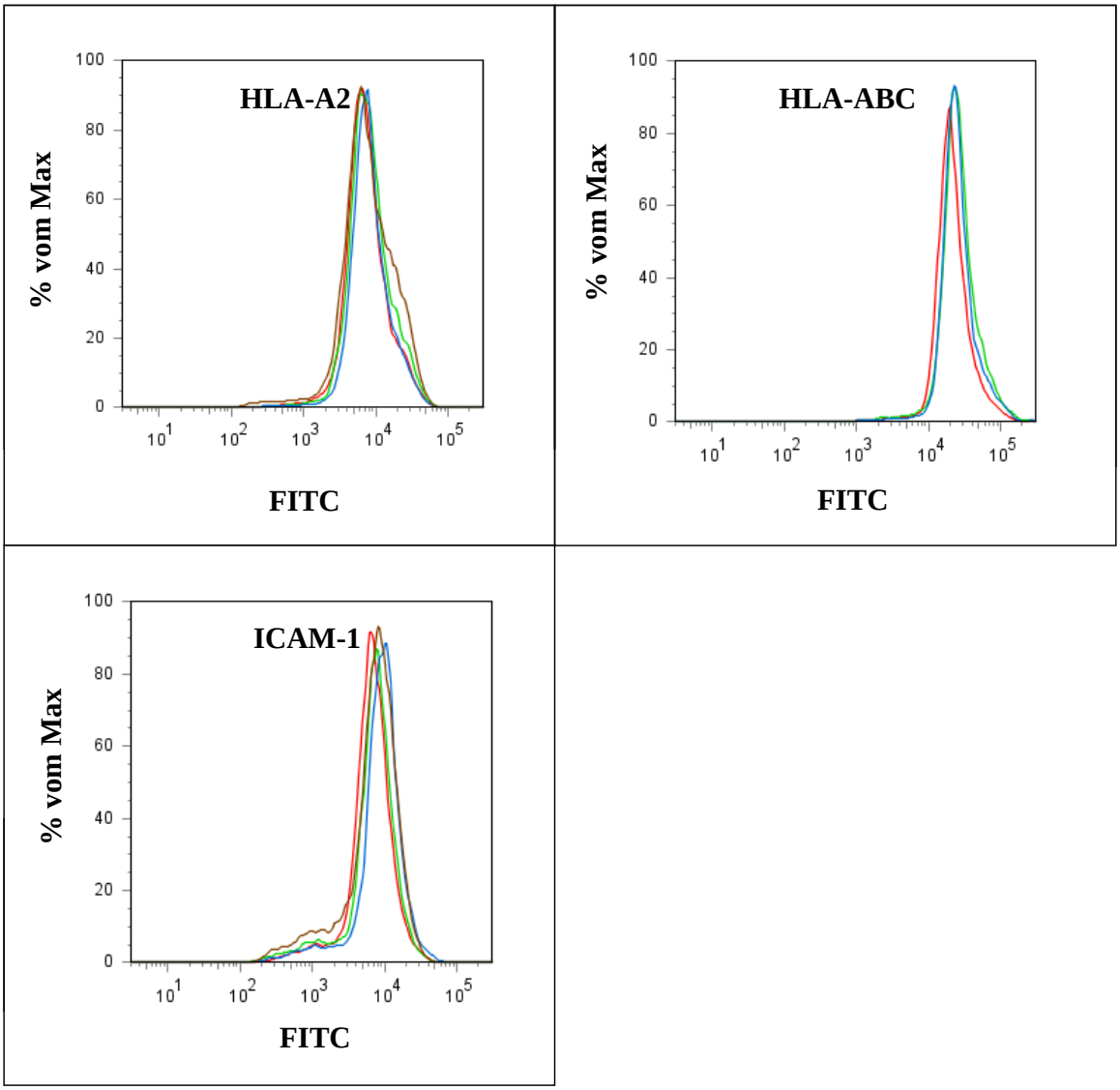


Abbildung C.10: **Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1, sowie HLA-A2 und HLA-ABC nach der Behandlung der DZ mit den AHL in der Konzentration 60 µM** (y-Achse: % vom Maximum, x-Achse: FITC).

DZ 1: w/o (Negativkontrolle), **DZ 2:** DZ + 3oxoC_4-HSL; **DZ 3:** DZ + C_{12}-HSL; **DZ 4:** DZ + 3oxoC_{12}-HSL (ø bedeutet ohne)

Rot: DZ 1, **Grün:** DZ 2, **Blau:** DZ 3, **Braun:** DZ 4

C.7. Einfluss von AHL auf die Zytokinproduktion von DZ

Zur quantitativen Bestimmung des sezernierten Zytokinmusters der DZ wurde ein Teil des abgenommenen Kulturüberstands mit einem Bio-Plex Pro™ Zytokintest analysiert (Abschnitt B.8.). Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse sind relativ zur jeweiligen Positivkontrolle (100%) gezeigt.

C.7.1. Zytokinproduktion von JC- und AHL-stimulierten DZ

Unter Einwirkung von JC und 3oxoC_4-HSL (Abbildung C.11) wurde eine gleich bleibende Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-13 und eine verminderte Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1beta, IL-8, TNF-alpha, MIP-1alpha, IFN-gamma, IL-12 und des entzündungshemmenden Zytokins IL-10 gemessen (25-75%). Für die Kultivierung der DZ mit JC in Gegenwart von C_{12}-HSL liegen keine Daten vor.
Bei der Stimulation mit JC und 3oxoC_{12}-HSL kam es ebenfalls zu einer verminderten Sekretion von IL-1beta, TNF-alpha, MIP-1alpha, IFN-gamma, IL-12 und IL-10 (45-85%).
Die pro-inflammatorischen Zytokine IL-8 ($\geq$ 150%) und IL-13 ($\leq$ 250%) wurden jedoch in Anwesenheit von JC und 3oxoC_{12}-HSL verstärkt synthetisiert, während die Sezernierung von IL-6 gleich blieb.

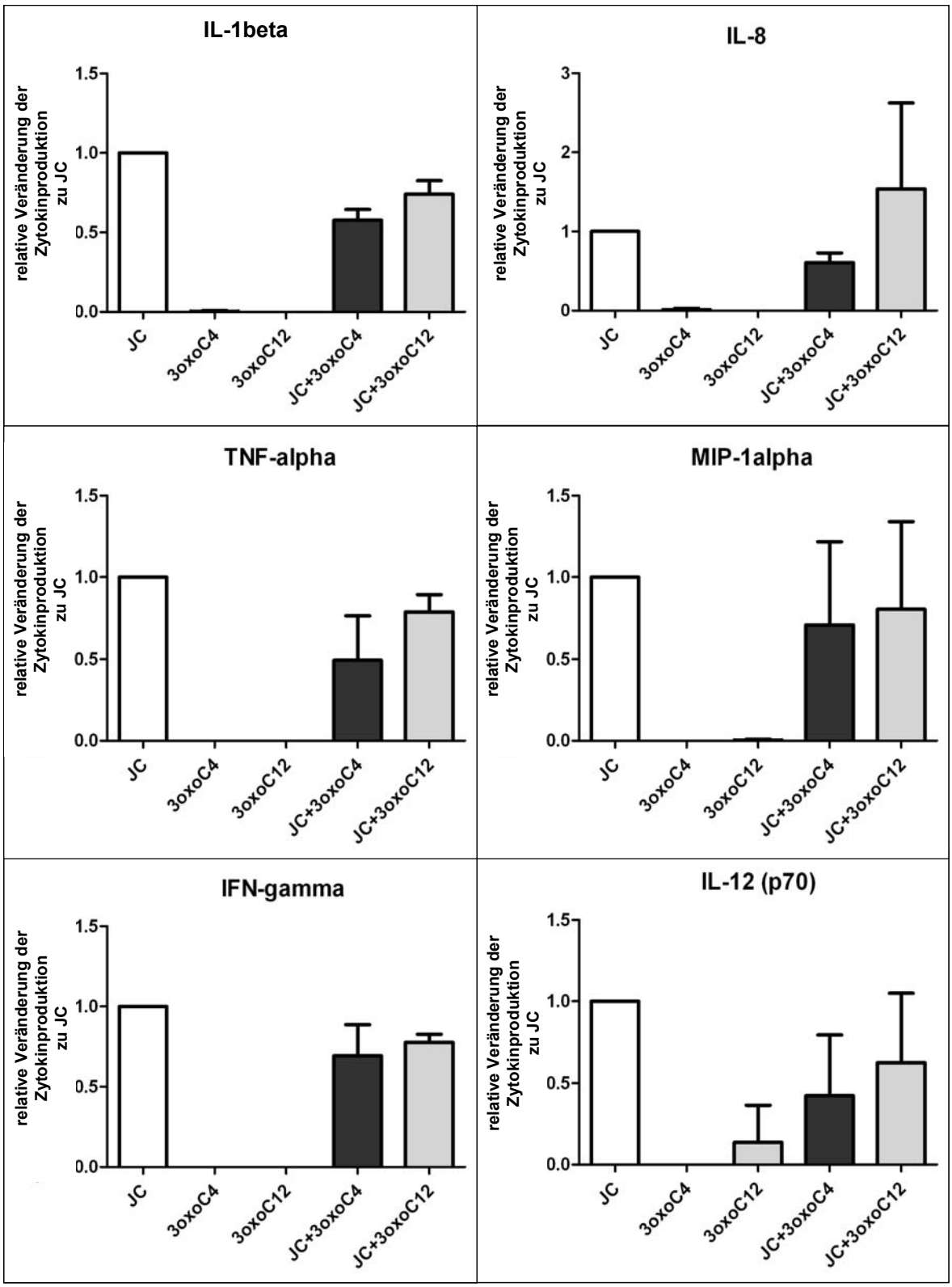


Abbildung C.11: Fortsetzung und Legende siehe nächste Seite

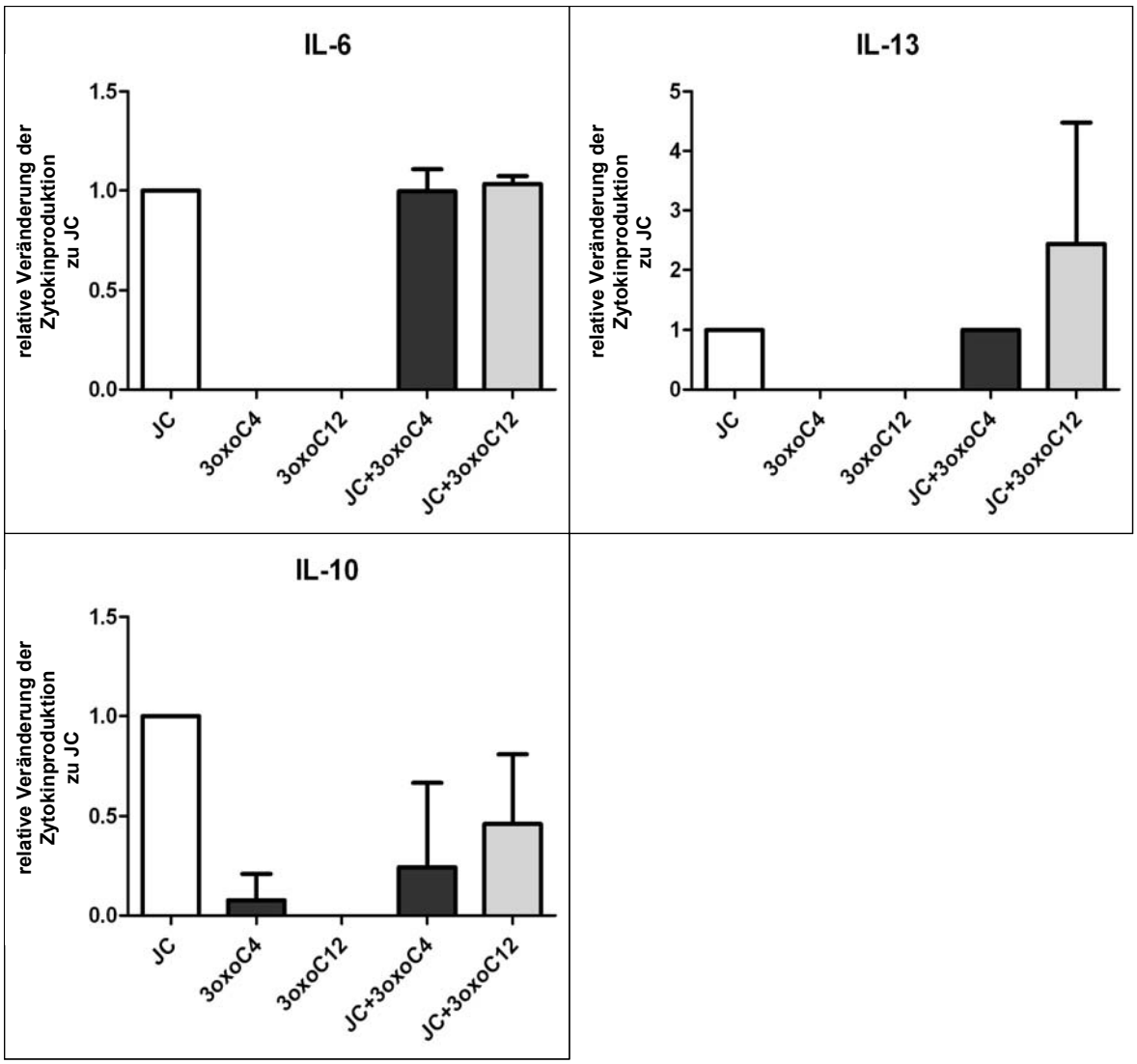


Abbildung C.11 (Fortsetzung von voriger Seite): **Analyse der Produktion der Zytokine IL-1beta, IL-8, TNF-alpha, MIP-1alpha, IFN-gamma, IL-12, IL-6, IL-13 und IL-10** (Zytokinproduktion gemessen in pg/ml relativ zu Jonuleit Cocktail JC=100%) **nach der Stimulation der DZ ohne bzw. mit JC und den AHL in der Konzentration 60 µM.** Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert dar (IL-1beta/IL-6/IL-8/IL-10/IL-12/MIP-1alpha/TNF-alpha/IFN-gamma n=3, IL-13 n=2; Dunn´s Multiple Comparison Test).

C.7.2. Zytokinproduktion von LPS- und AHL-stimulierten DZ

Durch die Stimulation mit LPS und 3oxoC$_4$-HSL veränderte sich die Zytokinsynthese der DZ im Vergleich zur Kontrolle nicht (Abbildung C.12). Eine Ausnahme bildete die Sekretion des entzündungsfördernden Zytokins IL-8, die um das 2,5-fache gesteigert war.

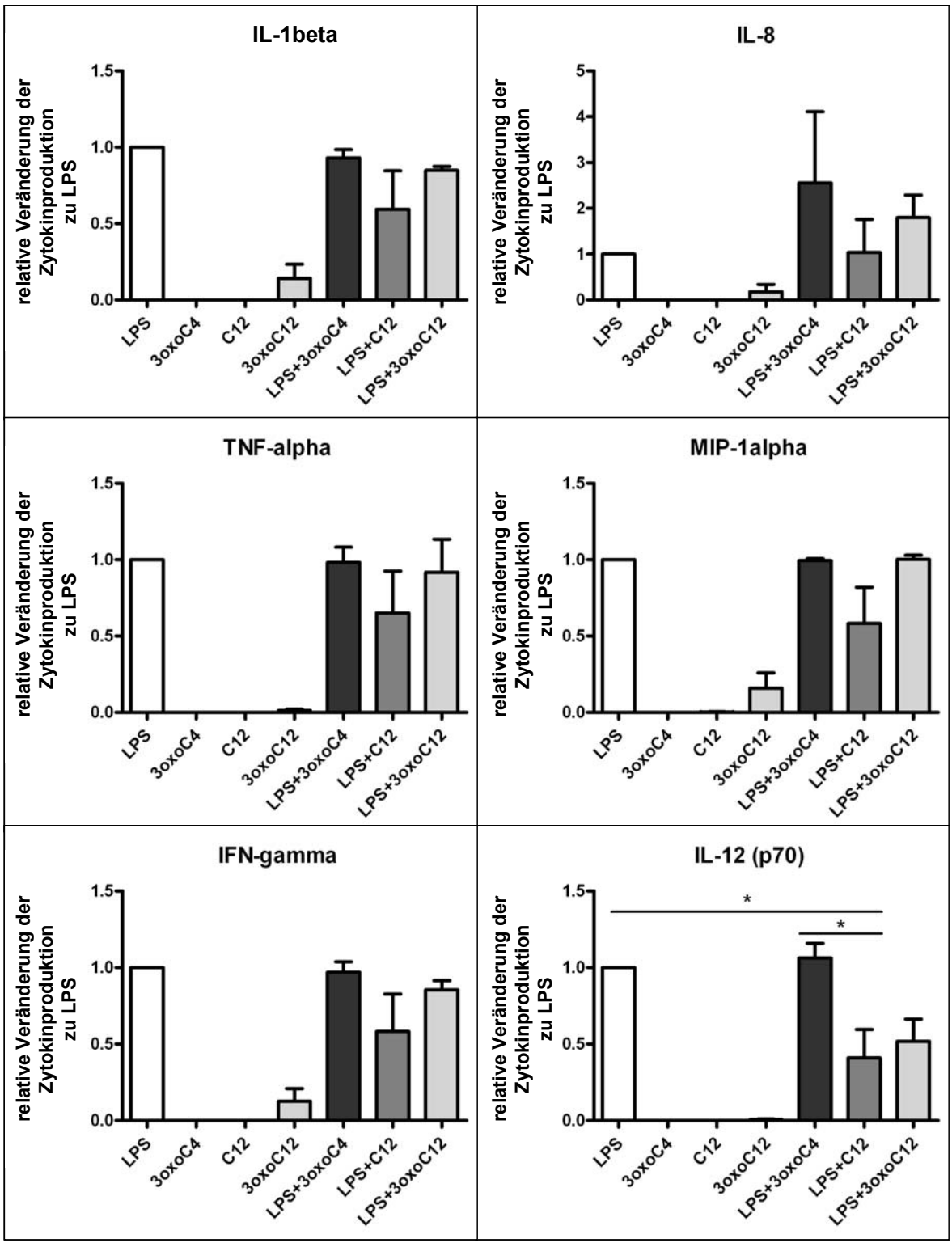


Abbildung C.12: Fortsetzung und Legende siehe nächste Seite

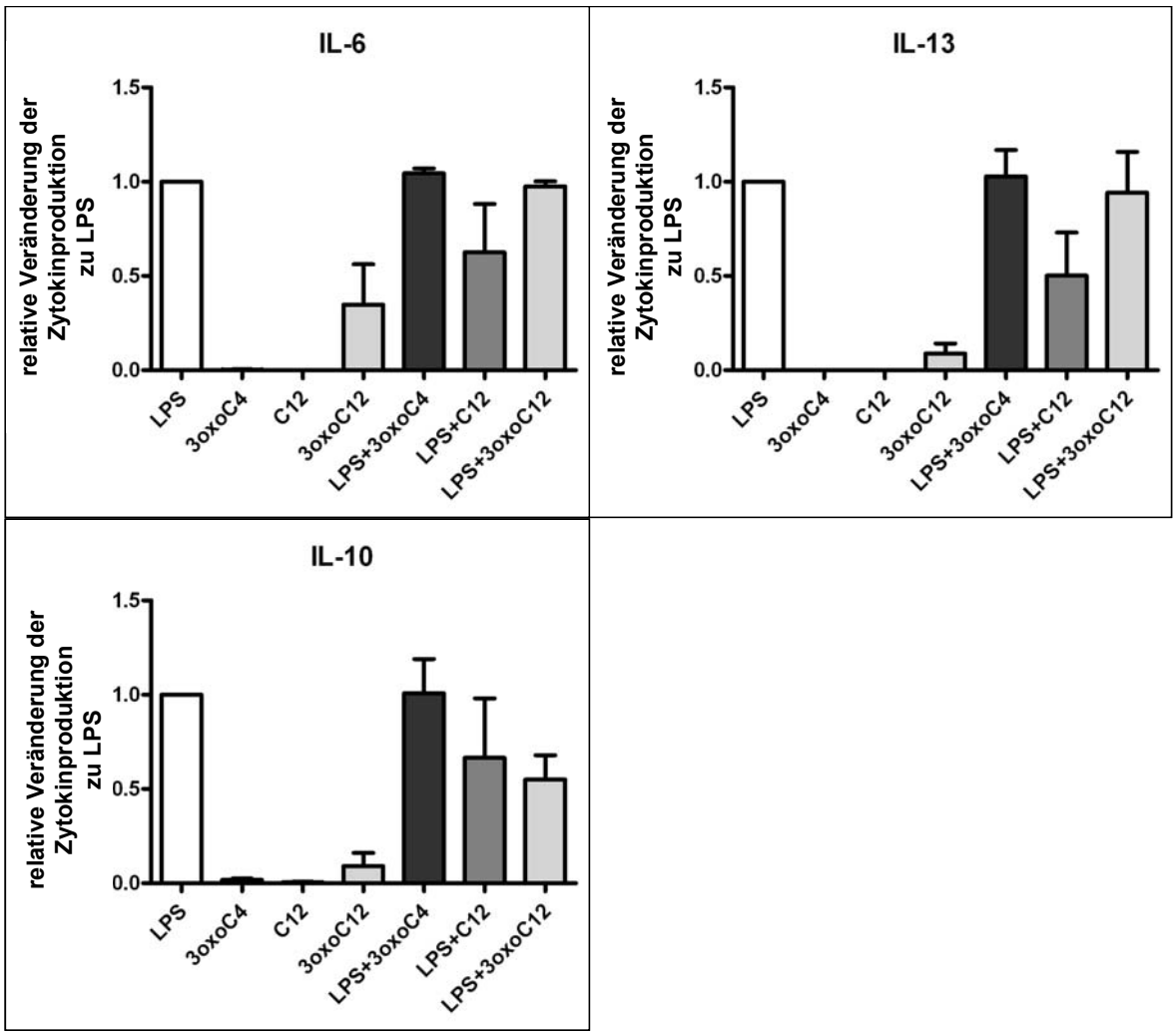


Abbildung C.12 (Fortsetzung von voriger Seite): **Analyse der Produktion der Zytokine IL-1beta, IL-8, TNF-alpha, MIP-1alpha, IFN-gamma, IL-12, IL-6, IL-13 und IL-10** (Zytokinproduktion gemessen in pg/ml relativ zu LPS=100%) **nach der Stimulation ohne bzw. mit LPS und den AHL in der Konzentration 60 µM.** Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert dar (IL-1beta/IL-6/IL-8/IL-10/IL-12/IL-13/MIP-1alpha/TNF-alpha/IFN-gamma n=5; Dunn´s Multiple Comparison Test, * $p< 0,05$).

DZ, welche mit LPS und C_{12}-HSL inkubiert wurden, sezernierten alle getesteten Zytokine in geringerem Maße (40-75%), außer IL-8 (100%). Das pro-inflammatorische Zytokin IL-12 wurde signifikant ($p< 0,05$) weniger produziert, verglichen mit der IL-12 Synthese der DZ, welche mit 3oxoC_4-HSL kultiviert wurden.

Zu geringeren Mengen an pro-inflammatorischen Zytokinen IL-1beta, TNF-alpha, IFN-gamma, IL-12 und an entzündungshemmenden Zytokin IL-10 im Kulturüberstand der DZ führte die Stimulation der Zellen mit LPS und 3oxoC_{12}-HSL (50-80%). Die Produktion von MIP-1alpha, IL-6 und IL-13 blieb unverändert. Die Synthese des pro-inflammatorischen Zytokins IL-8 stieg fast um das Doppelte an.

C.7.3. Vergleich des Einflusses von AHL auf die Zytokinproduktion der DZ

Bei Stimulation mit JC hatte 3oxoC_4-HSL einen herabregulierenden Effekt auf die Zytokinsynthese (Abbildung C.11). Im Gegensatz dazu hatte 3oxoC_4-HSL keinen Einfluss auf die LPS-stimulierten DZ (Abbildung C.12), mit Ausnahme auf die Produktion von IL-8.
Die Stimulation der DZ mit LPS und C_{12}-HSL inhibierte z.T. deutlich das Zytokinsyntheseprofil.
Diese Reduktion war auch bei den DZ, welche mit JC bzw. LPS und 3oxoC_{12}-HSL kultiviert wurden, nachweisbar. Somit ist gezeigt worden, dass die beiden Stimulationsansätze (JC + 3oxoC_{12}-HSL und LPS + 3oxoC_{12}-HSL) einen deutlichen herabregulierenden Effekt auf die Synthese einiger pro-inflammatorischer Zytokine (z.B. IL-12) und dem entzündungshemmenden Zytokin IL-10 hatten. Die Sekretion des entzündungsfördernden Zytokin IL-8 war bei beiden Ansätzen erhöht.

C.8. Einfluss von AHL auf das Migrationsverhalten von DZ

Um den Einfluss der jeweiligen AHL auf das Migrationsverhalten JC-stimulierter DZ zu testen, wurden Transwell®-Versuche mit dem Chemokin CXCL12 durchgeführt (Abschnitt B.9.). Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse sind relativ zu den jeweiligen Kontrollansätzen ohne Chemokin (-CXCL12)=100% bzw. mit Chemokin (+CXCL12)=100% gezeigt.

C.8.1. Prozentsatz der migrierten JC- und AHL-stimulierten DZ

Die Kultivierung der DZ mit JC und 3oxoC_4-HSL zeigte keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten der DZ bei Zugabe von CXCL12 (+CXCL12) (Abbildung C.13). Ohne Zusatz von CXCL12 (-CXCL12) migrierten 75% der JC- und 3oxoC_4-HSL stimulierten DZ spontan ins untere Kompartiment, verglichen zu Kontrolle (-CXCL12).

JC- und C_{12}-HSL-stimulierte DZ bewegten sich zu 85% ungerichtet, während nur 75% der DZ eine gerichtete Wanderung vollführten.

Wurden DZ mit JC und 3oxoC_{12}-HSL stimuliert, dann waren nur 40% der Zellen im unteren Kompartiment, wenn sich dort CXCL12 befand, verglichen zur Kontrolle (+CXCL12). Ohne CXCL12 migrierten 25% der Zellen.

Somit war eine Tendenz sichtbar, dass die spontane und gerichtete Migration der DZ entlang des CXCL12 Gradienten durch die Zugabe von JC und 3oxoC_{12}-HSL beeinträchtigt war, obwohl die Expression des Migrationsmarkers CD184 auf den DZ erhöht war. 3oxoC_4-HSL und C_{12}-HSL hatten keinen großen Einfluss auf das Migrationsverhalten der JC-stimulierten DZ.

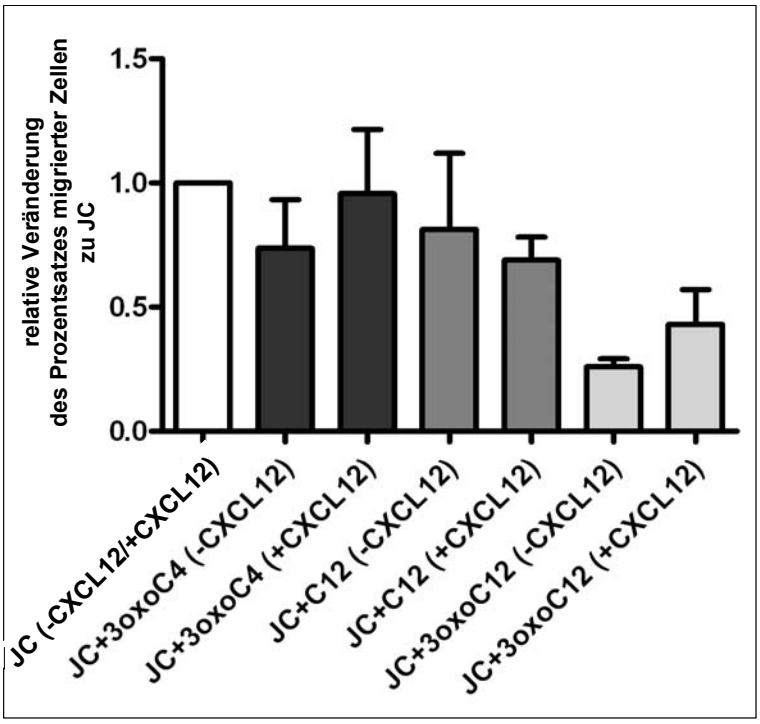


Abbildung C.13: **Migrationsverhalten ohne bzw. mit 100 ng/ml Chemokin CXCL12** (% relativ zu Jonuleit Cocktail JC=100%) **nach der Stimulation der DZ mit JC und den AHL in der Konzentration 60 µM.** Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert dar (n=3; Dunn´s Multiple Comparison Test). Die Werte sind auf die jeweilige Kontrolle JC (-CXCL12 bzw. +CXCL12)=100% bezogen.

C.9. Einfluss von AHL auf das Phagozytoseverhalten von Monozyten und DZ

Um zu testen, ob das AHL 3oxoC_{12}-HSL (Tabelle B.3) von *P. aeruginosa* einen Effekt auf die Phagozytoseaktivität humaner antigenpräsentierender Zellen hat, wurden diese mit den jeweiligen AHL (ohne JC bzw. LPS) mit prä-opsonierten, FITC-markierten Pseudomonaden-Stämmen inkubiert (Abschnitt B.1.7. und B.10.). In Vorversuchen wurde mit Monozyten (Abschnitt B.3.17.2.) gearbeitet, da die Generierung der DZ (Abschnitt B.3.17.4.) zu zeitintensiv war. Zu einer APZ wurden jeweils 100 Bakterien gegeben (MOI 1:100) (Tabelle B.18), da bei einem niedrigeren Einsatz von Bakterien (z.B. MOI 1:10) die interne Fluoreszenz der FITC-markierten Bakterien in den humanen Zellen zu gering war. Durch die Auslöschung der extrazellulären Fluoreszenz der Bakterien mit dem Farbstoff Trypanblau (+T) war die MFI der humanen Zellen immer niedriger als ohne Zugabe der Farblösung (-T). Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse sind relativ zu den jeweiligen Kontrollansätzen ohne Trypanblau (-T)=100% bzw. mit Trypanblau (+T)=100% gezeigt.

C.9.1. Phagozytosetest mit Monozyten und FITC-markierten Pseudomonaden

C.9.1.1. MFI der Monozyten nach der Phagozytose

Monozyten, welche mit FITC-markierten *Pseudomonas* spec. DSMZ 13134 und 3oxoC_4-HSL inkubiert wurden, phagozytierten ebenso viele Bakterien wie die Positivkontrolle (Abbildung C.14).

Bei einer Inkubation der Monozyten mit den fluoreszenzmarkierten Bakterien in Gegenwart von 60 µM C_{12}-HSL (+T) war die MFI um 10% verringert.

Signifikant vermindert war die Phagozytoseaktivität bei einer Inkubation der Monozyten mit den Bakterien und 3oxoC_{12}-HSL (+T). Hier wurde nur eine MFI von 75% detektiert.

Bei Monozyten, welche mit FITC-markierten *P. aeruginosa* P1E und dem jeweiligen AHL inkubiert wurden, waren die Ergebnisse ähnlich (Abbildung C.15); auch hier war die Phagozytoseleistung der Monozyten mit der Zugabe von 3oxoC_{12}-HSL (+T) am meisten verringert.

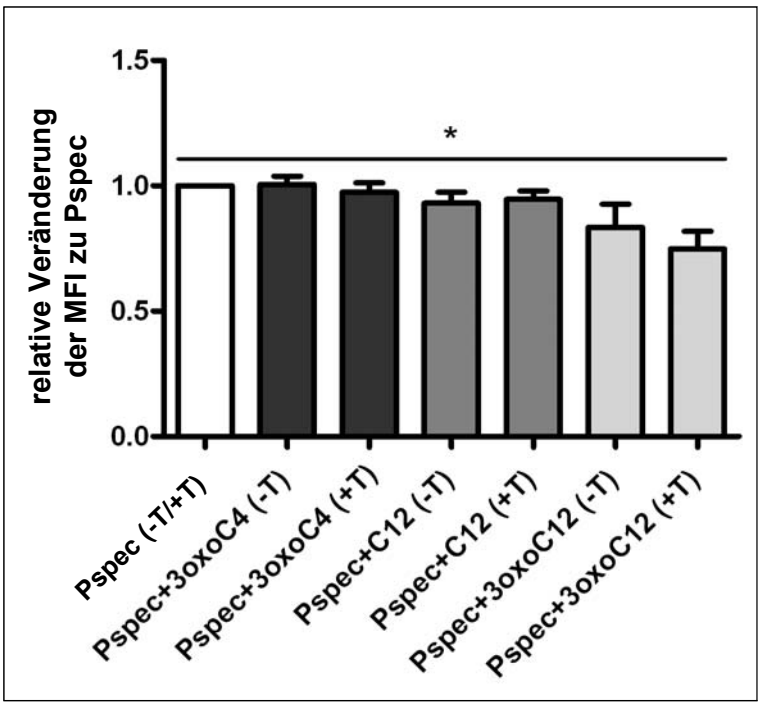


Abbildung C.14: **Phagozytoserate von *Pseudomonas* spec. DSMZ 13134 (Pspec)** ohne bzw. mit Trypanblau (-T bzw. +T) (MFI relativ zu Pspec=100%) **nach der Behandlung der Monozyten mit den AHL in der Konzentration 60 µM.** Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert dar (n=5; Dunn´s Multiple Comparison Test, * p< 0,05). Die Werte sind auf die jeweilige Kontrolle Pspec (-T bzw. +T)=100% bezogen.

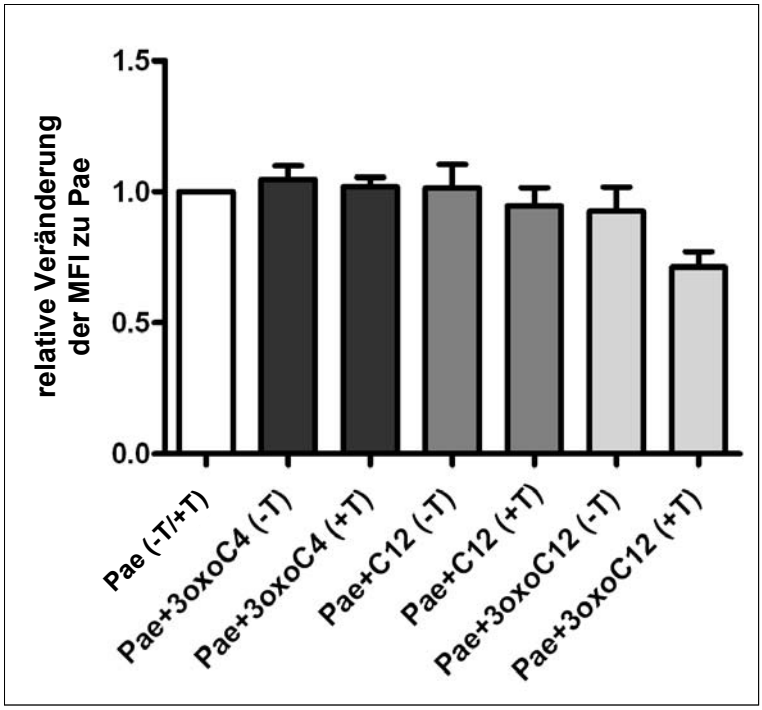


Abbildung C.15: Legende siehe nächste Seite

Abbildung C.15 (Fortsetzung von voriger Seite): **Phagozytoserate von *Pseudomonas aeruginosa* P1E (Pae)** ohne bzw. mit Trypanblau (-T bzw. +T) (MFI relativ zu Pae=100%) **nach der Behandlung der Monozyten mit den AHL in der Konzentration 60 µM.** Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert dar (n=4; Dunn´s Multiple Comparison Test). Die Werte sind auf die jeweilige Kontrolle Pae (-T bzw. +T)=100% bezogen.

C.9.2. Phagozytosetest mit DZ und *P. aeruginosa* P1E-FITC

C.9.2.1. MFI der DZ nach der Phagozytose

Bei der Inkubation der DZ mit AHL (3oxoC_4-HSL, C_{12}-HSL und 3oxoC_{12}-HSL) und FITC-markierten *P. aeruginosa* P1E wurde die MFI der Zellen ebenfalls unterschiedlich beeinflusst. In Anwesenheit von 60 µM 3oxoC_4-HSL (+T) nahm die MFI kaum und mit der Zugabe von C_{12}-HSL (+T) um ca. ein Viertel ab (Abbildung C.16).

Die Anwesenheit von 3oxoC_{12}-HSL (+T) führte dagegen zu einem signifikanten Unterschied ($p< 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle (100%). Hier hatten die DZ mehr als die Hälfte ihrer Phagozytoseleistung verloren.

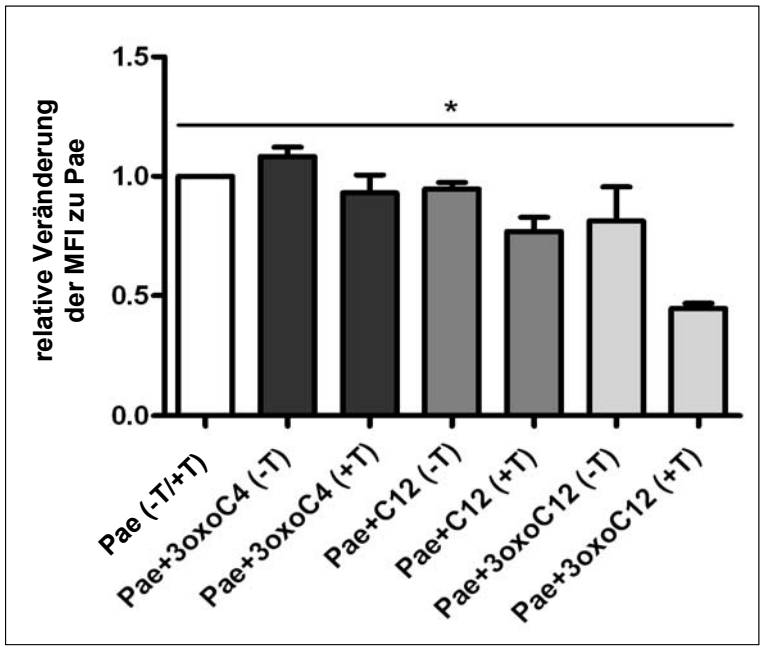


Abbildung C.16: **Phagozytoserate von *Pseudomonas aeruginosa* P1E (Pae)** ohne bzw. mit Trypanblau (-T bzw. +T) (MFI relativ zu Pae=100%) **nach der Behandlung der DZ mit den AHL in der Konzentration 60 µM.** Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert dar (n=3; Dunn´s Multiple Comparison Test, * $p< 0,05$). Die Werte sind auf die jeweilige Kontrolle Pae (-T bzw. +T)=100% bezogen.

C.9.3. Lokalisierung der phagozytierten Bakterien in den Monozyten und DZ

C.9.3.1. Detektion von *P.* spec. DSMZ 13134-GFP in den Monozyten mittels Epifluoreszenzmikroskopie

Mittels Epifluoreszenzmikroskopie (Abschnitt B.11.1.) wurden Monozyten, welche immunzytologisch mit PE-markierten Antikörpern gegen CD14 gefärbt waren (Abschnitt B.10.1.), nach der Kokultivierung mit *P.* spec. DSMZ 13134-GFP, aufgenommen. Mehrere runde, grün-fluoreszierende Einschlüsse waren im Monozyten sichtbar (Abbildung C.17 D.).

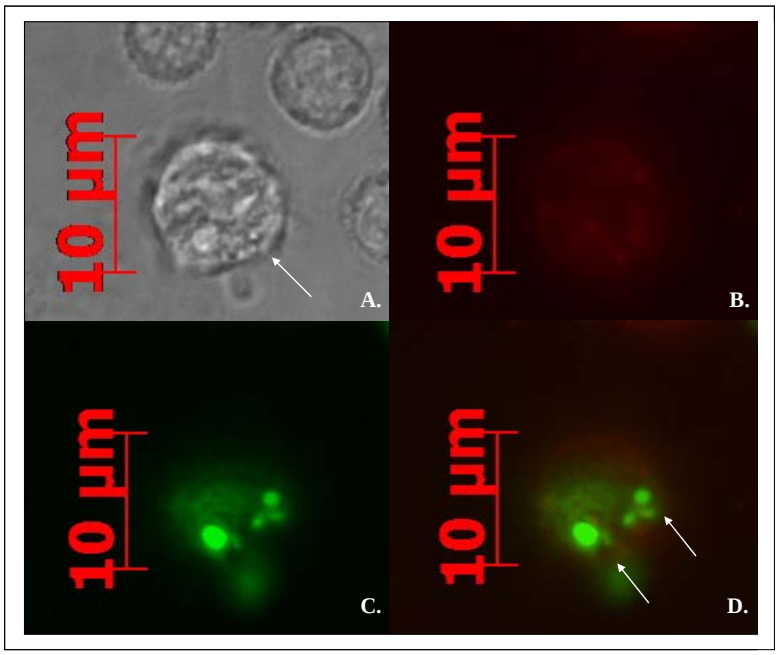


Abbildung C.17: **Epifluoreszenzaufnahmen von GFP-markierten *Pseudomonas* spec. DSMZ 13134 nach der Phagozytose durch PE-gefärbte Monozyten (CD14). A.** Phasenkontrastaufnahme des Monozyten (siehe Pfeil) **B.** PE-gefärbter Monozyt (rot) **C.** Phagozytierte GFP-markierte *Pseudomonas* spec. (grün) in den Phagosomen im Monozyt **D.** Überlagertes Bild des PE-gefärbten Monozyten und der GFP-markierten *Pseudomonas* spec. (siehe Pfeile) in den Phagosomen.

C.9.3.2. Detektion von *P.* spec. DSMZ 13134-GFP in den Monozyten mittels CLSM

Um zu beweisen, dass sich die GFP-markierten Pseudomonaden tatsächlich im Innern der Zelle befinden, wurden mikroskopische Aufnahmen mit dem CLSM gemacht. Mit diesem Mikroskop ist eine räumliche Darstellung der Zelle möglich (Abschnitt B.11.5.).
Abbildung C.18 zeigt einen rot-fluoreszierenden Monozyten, der nach der Inkubation mit *P.* spec. DSMZ 13134-GFP mit dem Antikörper CD14 APC gefärbt wurde (Abschnitt B.10.1.). Deutlich erkennbar sind grün-fluoreszierenden Einschlüsse im Zellinnern des Monozyten.

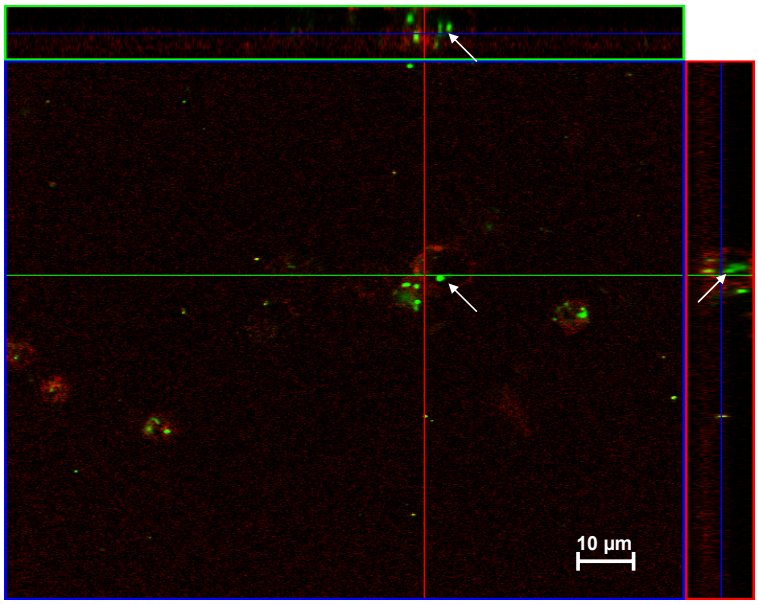


Abbildung C.18: **CLSM-Aufnahme von GFP-markierten *Pseudomonas* spec. DSMZ 13134 und Monozyten.** Orthogonale Ansicht eines dreidimensionalen, konfokalen Bildes eines APC-gefärbten Monozyten (CD14) nach der Inkubation mit GFP-markierten *Pseudomonas* spec. DSMZ 13134 aus einem z-Stapel von xy-Scans. Im blau umrahmten Hauptfenster ist der Monozyt (rot) mit mehreren Phagosomen aus einem solchen z-Stapel zu sehen. Die roten und grünen Linien repräsentieren vertikale optische Schnitte durch den Bildstapel, wobei die so entstandene Seitenansicht jeweils in den entsprechenden farbig umrahmten Seitenfenstern dargestellt ist. In dieser Seitenansicht wiederum zeigt die blaue Linie die Position des Hauptbildes innerhalb des z-Stapels an. Sichtbar ist hier die interne grüne Fluoreszenz der phagozytierten GFP-markierten *Pseudomonas* spec. in den Phagosomen (siehe Pfeile).

C.9.3.3. Detektion der *P.* spec. DSMZ 13134-GFP in den Lysosomen der Monozyten mittels Epifluoreszenzmikroskopie

Lysosomen enthalten hydrolytische Enzyme, welche endogenes und exogenes Material in humanen Zellen verdauen. Deshalb wurden Kolokalisationstudien mit Lysotracker® Red DND-99 angefärbten Lysosomen in Monozyten und den grün-fluoreszierenden, phagozytierten, GFP-markierten *P.* spec. DSMZ 13134 durchgeführt (Abschnitt B.10.2.). In Abbildung C.19 D. ist deutlich sichtbar, dass die Bakterien in den Monozyten in Phagolysosomen lokalisiert waren, da die Lysotracker®-Markierung und die GFP-Markierung der phagozytierten Bakterien zusammen fiel.

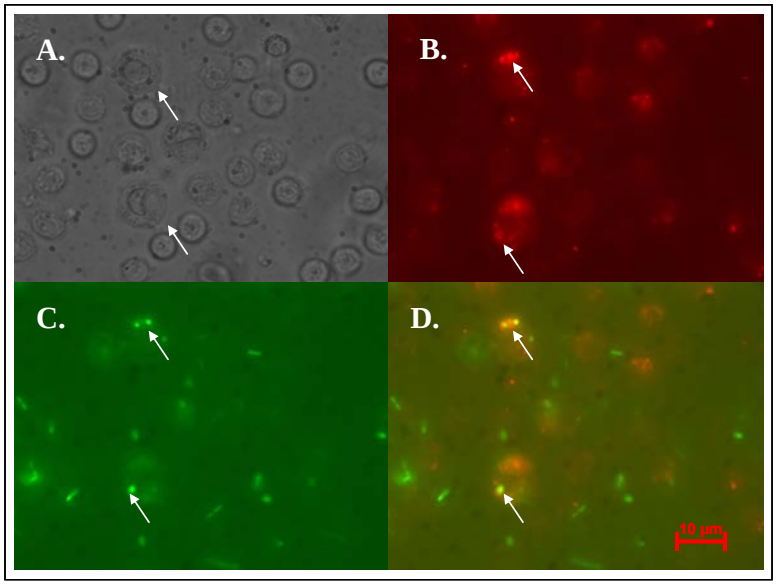


Abbildung C.19: **Epifluoreszenzaufnahmen der Kolokalisierung der GFP-markierten *Pseudomonas* spec. DSMZ 13134 mit den Lysosomen nach der Phagozytose durch Monozyten.** Die Lysosomen sind mit einem rot fluoreszierenden Lysotracker® gefärbt. **A.** Phasenkontrastaufnahme von PBMZ (Monozyten siehe Pfeile) **B.** Fluoreszierende Lysosomen in den Monozyten (rot, siehe Pfeile) **C.** Phagozytierte GFP-markierte *Pseudomonas* spec. (grün, siehe Pfeile) in den Phagosomen in den Monozyten **D.** Überlagertes Bild der rot gefärbten Lysosomen und der GFP-markierten *Pseudomonas* spec. in den Phagosomen der Monozyten. Die Kombination der Fluoreszenzsignale resultiert in einer gelben Farbe, es handelt sich deshalb um Phagolysosomen (siehe Pfeile).

C.9.3.4. Detektion von *P.* spec. DSMZ 13134 in den Monozyten mittels Hellfeldmikroskopie

Nach der Inkubation der peripheren mononuklearen Blutzellen mit *P.* spec. DSMZ 13134 wurde eine Pappenheimfärbung mit dem getrockneten, humanen Zellausstrich durchgeführt (Abschnitt B.10.3.). Durch diese Art der Färbung können zellinterne Strukturen sichtbar gemacht werden, wobei es sich in Abbildung C.20 B. vermutlich um Phagolysosomen handelt. Diese Einschlüsse wurden nur in Monozyten, welche mit Bakterien inkubiert worden waren, gefunden.

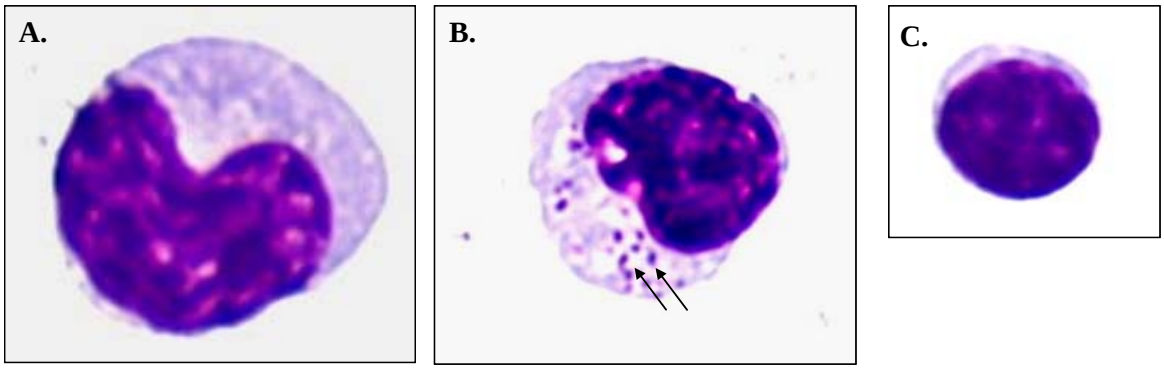


Abbildung C.20: **Hellfeldmikroskopische Aufnahme einer Pappenheim-Färbung eines Monozyten, welcher ohne bzw. mit *Pseudomonas* spec. DSMZ 13134 inkubiert wurde und eines Lymphozyten.**
A. Monozyt ohne *Pseudomonas* spec. inkubiert **B.** Monozyt mit *Pseudomonas* spec. inkubiert. Die Pfeile verweisen auf die Phagosomen im Monozyten **C.** Kontaminierender Lymphozyt.

C.9.3.5. Detektion der *P. aeruginosa* P1E-FITC in den DZ mittels CLSM

In Abbildung C.21 ist die interne Grünfluoreszenz der phagozytierten FITC-markierten *P. aeruginosa* P1E (Abschnitt B.1.7.) in den Phagosomen der DZ sichtbar. Die Zellmembran der ungefärbten DZ erscheint deshalb grün, weil die DZ eine gewisse Autofluoreszenz besitzen und jegliche Fluoreszenz mit der Software ImageJ grün dargestellt wurde. Unter dem CLSM war die Zellwand der DZ kaum sichtbar.

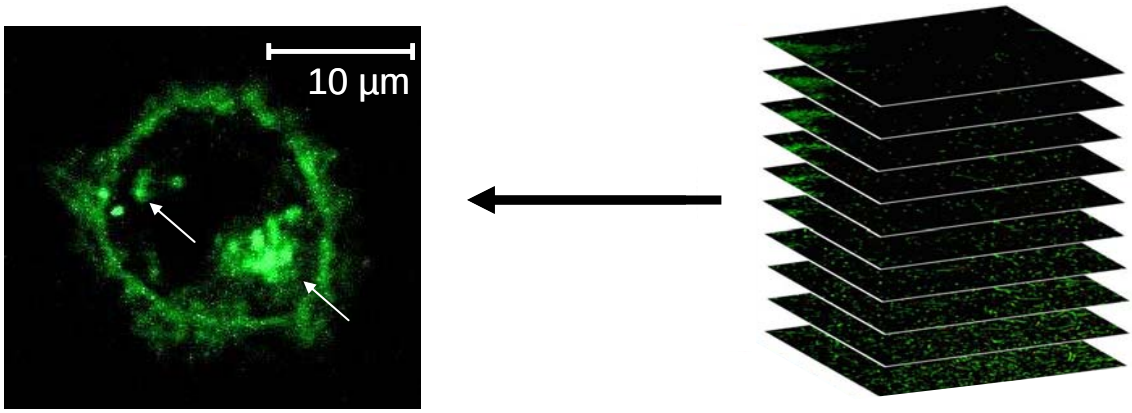


Abbildung C.21: **Ansicht einer einzelnen Schnittebene (Ebene 21 aus 64) aus einem z-Stapel einer DZ (ungefärbt) nach der Inkubation mit FITC-markierten *Pseudomonas aeruginosa* P1E und Zugabe von Trypanblau.** Die Pfeile verweisen auf die interne grüne Fluoreszenz der FITC-markierten *P. aeruginosa* in den Phagosomen.

C.10. Einfluss von AHL auf die T-Zellstimulationseigenschaften von DZ

Um zu klären, ob die Kultivierung der DZ mit den AHL, vor allem 3oxoC_{12}-HSL, einen Effekt auf T-zellstimulierende Eigenschaften der DZ hat, wurde getestet (Abschnitt B.12.), ob eine peptidunabhängige allo-MHC Klasse I (hier HLA-A2) T-Zellstimulation, die im Wesentlichen von der Expressionsdichte des HLA-Klasse I-Moleküls A2 und Adhäsionsmolekülen bestimmt ist, beeinflusst wurde.

Dazu wurde der peptidunabhängige JB4-ZTL mit AHL-behandelten DZ kokultiviert und danach die IFN-gamma Konzentration im Kulturüberstand mittels ELISA gemessen (n=3). Da die T-Zellen für jeden Versuch neu angesetzt werden müssen und die T-Zellen variieren können (z.B. wie viel IFN-gamma sie bei Stimulation produzieren), wurde immer

eine Tumorzelllinie als Kontrolle mitgeführt, die konstante Stimulationsfähigkeit hat. So konnte die jeweilige Qualität der T-Zelle angezeigt werden. In Abbildung C.22 ist exemplarisch ein Experiment gezeigt, welches repräsentativ für die drei durchgeführten Experimente steht, welche vergleichbare Ergebnisse zeigten.

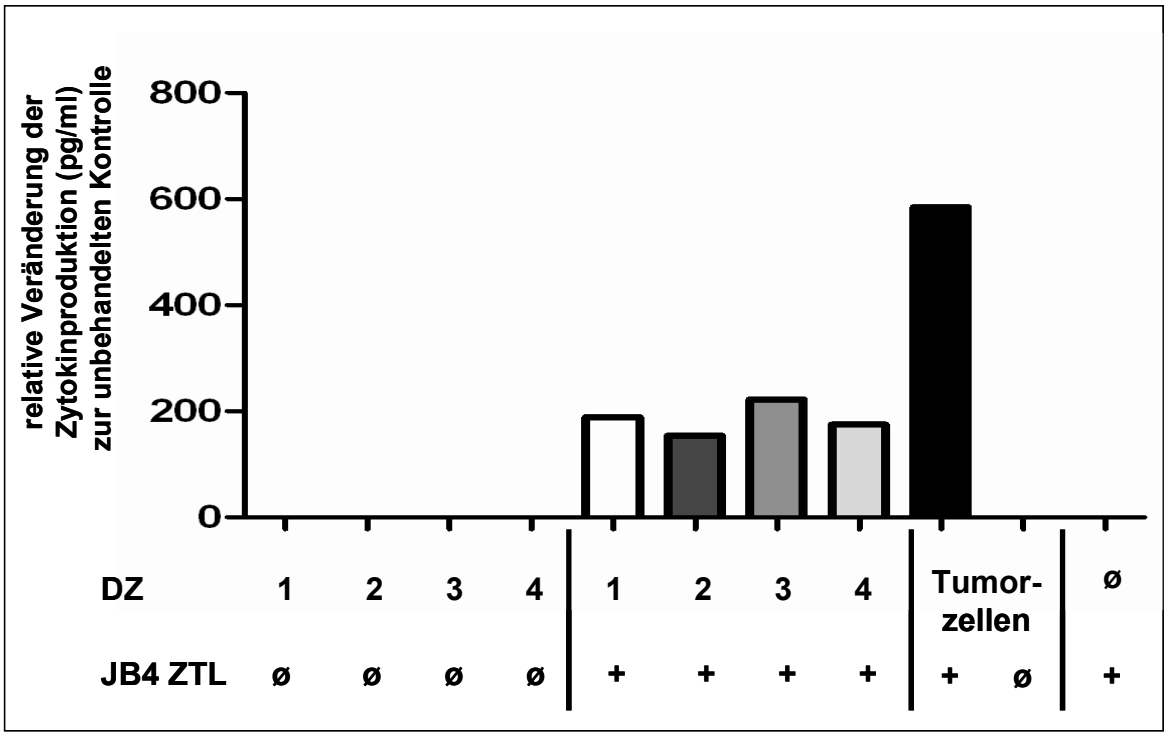


***Abbildung C.22*: IFN-gamma Zytokinproduktion (pg/ml) der JB4-ZTL nach Kokultivierung mit AHL-behandelten DZ (AHL-Konzentration 60 µM).** In den Kontrollansätzen wurden die AHL-behandelten DZ jeweils ohne JB4-ZTL kokultiviert. Die Kokultivierung einer Tumorzelllinie mit den JB4-ZTL und die Kultivierung der JB4-ZTL alleine dienten ebenfalls als Kontrollen (n=1).

DZ 1: w/o (Negativkontrolle), **DZ 2:** DZ + 3oxoC_4-HSL; **DZ 3:** DZ + C_{12}-HSL; **DZ 4:** DZ + 3oxoC_{12}-HSL (ø bedeutet ohne)

Die JB4-ZTL produzierten ohne Zugabe von Stimulationszellen kein IFN-gamma. Die AHL-behandelten DZ (ohne JC- bzw. LPS-Stimulation) alleine, ohne Zugabe von T-Zellen, synthetisierten ebenfalls kein IFN-gamma. JB4-ZTL, welche mit den Tumorzellen kokultiviert wurden, sezernierten IFN-gamma. So konnte gezeigt werden, dass die IFN-gamma Produktion stimulationsabhängig war. In allen drei durchgeführten Experimenten stimulierten die unbehandelten DZ die IFN-gamma Produktion der JB4-ZTL in gleicher Weise wie AHL-behandelte DZ. Dieses Ergebnis war konsistent mit dem Ergebnis, dass die getesteten AHL die MHC Klasse I und ICAM-1 Oberflächenmarkerexpression nicht beeinflussten. AHL beeinträchtigen also die Fähigkeit der DZ zur T-Zellstimulation nicht.

D. DISKUSSION

D.1. Eigenschaften und Wirkungen der AHL

Dass Signalmoleküle nicht nur als Autoinducer in Quorum sensing-Systemen von Bakterien eine Rolle spielen, sondern auch als Virulenzfaktoren das pflanzliche und humane Immunsystem modulieren, ist mehrfach gezeigt worden (Telford, G. *et al.* 1998; Übersicht in Bauer, W. D. *et al.* 2004; Ritchie, A. J. *et al.* 2005; Schuhegger, R. *et al.* 2006). Daher werden die AHL seit längerem als therapeutische Zielstrukturen diskutiert. Welche Mechanismen im Einzelnen eine Rolle spielen, konnte jedoch bisher nicht genau demonstriert werden. Studien zeigten, dass eine lange Acylkette ($\geq C_{11}$), ein intakter Homoserinlacton-Ring und eine Oxo- oder Hydroxy-Substitution für ihre Bioaktivität notwendig sind (Chhabra, S. R. *et al.* 2003; Horikawa, M. *et al.* 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurden die AHL in einer Konzentration von 60 µM eingesetzt. Durchgeführte Vitalitätstests zeigten, dass die eingesetzte Konzentration von 60 µM AHL keine Auswirkung auf die Lebensfähigkeit der generierten DZ nach 24 h Inkubation hatte (Abschnitt C.4., Abbildung C.4).
In Studien mit murinen Makrophagen aus dem Knochenmark führten Konzentrationen von 12-50 µM an 3oxoC_{12}-HSL zu morphologischen Veränderungen, die auf Apoptose hinwiesen, während eine identische C_4-HSL-Konzentration diesbezüglich keine Effekte zeigte (Tateda, K. *et al.* 2003). Bei einer Konzentration von 10 µM zeigte 3oxoC_{12}-HSL keine toxischen Effekte auf murine T-Zellen, während Konzentrationen von 1-10 µM toxische Effekte auf murine nicht-lymphoide Milzzell-Populationen, d.h. Monozyten und Neutrophile, hatten (Ritchie, A. J. *et al.* 2005). Weiter wurde berichtet, dass eine Konzentration von $\geq$ 50 µM 3oxoC_{12}-HSL toxisch auf LPS-stimulierte murine DZ aus dem Knochenmark wirkte (Skindersoe, M. E. *et al.* 2009), während 100 µM über einen Zeitraum von 24-48 h keine negativen Auswirkungen auf humane polymorphonukleare Neutrophile (PMN) zeigte (Wagner, C. *et al.* 2007). Nach 24 h Inkubation von generierten humanen LPS-stimulierten DZ mit 3oxoC_{12}-HSL (100 µM) konnte ein Zuwachs von 15% apoptotischen Zellen detektiert werden (Boontham, P. *et al.* 2008).

So ist die Frage nach der physiologisch relevanten Konzentration an 3oxoC_{12}-HSL für alle *in vitro* Studien von großer Bedeutung (Pritchard, D. I. *et al.* 2005) und muss für jedes verwendete Modellsystem überprüft werden.

Weiter ist der Effekt der AHL auf eukaryotische Zellen von der Menge und Art des verwendeten Antigens bzw. Mitogens abhängig, wie auch von der Konzentration des verwendeten Signalmoleküls. So beschreibt Skindersoe *et al.* (2009), dass die Höhe der Expression von CD40 Molekülen auf generierten murinen DZ von der 3oxoC_{12}-HSL Konzentration abhängig war (Skindersoe, M. E. *et al.* 2009). Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, in der die Reifung der DZ mit unterschiedlichen Mengen an LPS und einer definierten Menge an JC (Jonuleit, H. *et al.* 1997) induziert wurde. Je geringer die Menge an LPS (0,05 µg/ml) und je höher die Konzentration an 3oxoC_{12}-HSL war, desto weniger Oberflächenmoleküle wurden exprimiert (Abschnitt C.3., Abbildung C.1 und C.2). Stieg der LPS Gehalt (0,1 µg/ml) im Kulturmedium jedoch an, wurden auch mehr Oberflächenmoleküle, trotz hoher Zugaben von 3oxoC_{12}-HSL (100 µM) exprimiert (Abbildung C.3). Das bedeutet möglicherweise, dass die in höherem Maße aktivierten DZ von 3oxoC_{12}-HSL funktionell weniger deutlich eingeschränkt werden können.

Es wird vermutet, dass der inhibitorische Effekt von 3oxoC_{12}-HSL auf die Proliferation und Zytokinproduktion von T-Zellen durch eine Interaktion mit Oberflächenstrukturen, aber auch auf intrazellulärer Ebene, im Zytoplasma oder im Kern vermittelt wird, wo sie die Signaltransduktionskaskade nach der TZR Ligation stören (Ritchie, A. J. *et al.* 2005; Ritchie, A. J. *et al.* 2007). Die Auswirkungen von 3oxoC_{12}-HSL können zusätzlich bei einer Infektion durch bakterielle Lipopolysaccharide oder andere Komponenten, die mit den Toll-like-Rezeptoren interagieren, moduliert sein. In diesem Fall wird angenommen, dass diese Inhibition mit einer Interaktion von 3oxoC_{12}-HSL und TLR4 zustande kommt (Ritchie, A. J. *et al.* 2007). In humanen alveolaren Makrophagen und in humanen Makrophagen aus dem Knochenmark konnte eine Störung des LPS-induzierten (100 ng/ml) NF-κB Signalwegs durch den Einfluss von 3oxoC_{12}-HSL (10-25 µM), welches in *P. aeruginosa*-Kulturen (n=5) in einer Konzentration von 4,7 µM nachgewiesen wurde, gezeigt werden (Kravchenko, V. V. *et al.* 2008). Der größte Anteil an zell-assoziiertem 3oxoC_{12}-HSL ist durch Fraktionierungstechniken, in denen einzelne

Zellkomponenten aufgetrennt wurden, im Zytoplasma der Zelle nachgewiesen worden. Dennoch konnte bisher kein Molekül in der humanen Zelle beschrieben werden, an welche AHL spezifisch binden. (Ritchie, A. J. *et al.* 2003; Ritchie, A. J. *et al.* 2005; Ritchie, A. J. *et al.* 2007). Es wird aber davon ausgegangen, dass 3oxoC_{12}-HSL entweder mit vorhandenen Molekülen, z.B. des NF-κB-Signalwegs bzw. der NF-κB-abhängigen Signalwege oder mit einer ganzen Reihe verschiedener Oberflächenstrukturen oder zellulärer Komponenten unspezifisch in Wechselwirkung steht. Dies würde auch die Variation an Ergebnissen der verschiedenen Studien erklären (Ritchie, A. J. *et al.* 2003).
Anhand der Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit könnte die Vermutung aufgestellt werden, dass 3oxoC_{12}-HSL u.a. die TLR4 teilweise unspezifisch inaktiviert und dies zu einer verminderten Erkennung von *P. aeruginosa* führt, wodurch der Keim sich ungehindert im Gewebe ausbreiten kann. Dies würde zur chronischen Kolonisation beitragen und im Verlauf zu pulmonalem Versagen führen. Da JC-stimulierte DZ unter dem Einfluss des Signalmoleküls ebenfalls in ihrer Funktion beeinträchtigt waren, müssen jedoch weitere Angriffspunkte in der eukaryotischen Zelle vorhanden sein.

Wie in der Literatur beschrieben und auch in dieser Arbeit gezeigt, wurde durch die Stimulation der DZ mit JC der Reifungsprozess der DZ (Abbildung C.5), im Vergleich zu LPS (Abbildung C.7), stärker ausgelöst; dabei kommt es vergleichsweise zu einer höheren Expression der Oberflächenmoleküle CD40, CD54, CD58, CD80, CD83, CD86 und MHC Klasse II. Dies steigert die immunaktivierende Fähigkeit der DZ und wird vor allem durch die Kombination von PGE_2 und TNF-alpha, welche im JC enthalten sind, erreicht (Jonuleit, H. *et al.* 1997; Steinbrink, K. *et al.* 2000; Thurnher, M. *et al.* 2001; Rieser, C. *et al.* 1997).

Die Zugabe von AHL zu einer Kultur wirkt sich innerhalb kurzer Zeit auf die Funktion der eukaryotischen Zellen aus. So inhibierte 3oxoC_{12}-HSL innerhalb von 2 h die T-Zellproliferation (Ritchie, A. J. *et al.* 2005). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass C_4-HSL nach 15-stündiger Inkubationsdauer in Ab- und Anwesenheit von Zellen immer noch bioaktiv war, während 90% des 3oxoC_{12}-HSL in Anwesenheit von Zellen keine Bioaktiviät mehr zeigten. Diese Inaktivierung konnte in Abwesenheit der Zellen nicht beobachtet werden (Skindersoe, M. E. *et al.* 2009). Daraus wurde geschlossen, dass kurzkettige AHL demnach mehr der nicht-enzymatischen pH-abhängigen Lactonolyse

unterliegen als langkettige AHL (Yates, E. A. *et al.* 2002). Da 3oxoC_{12}-HSL seine Funktion in Anwesenheit der Zellen verloren hatte, wurde davon ausgegangen, dass es während der Inkubation durch sezernierte Enzyme der Zellen (z.B. Paraoxonasen) abgebaut wurde (Chun, C. K. *et al.* 2004; Yang, F. *et al.* 2005). Weitere Studien zeigten, dass vor allem humane Zellen aus der Lunge 3oxoC_{12}-HSL abbauen können. So war *in vitro* 3oxoC_{12}-HSL im Kulturmedium nach Zugabe zu humanen Atemwegsepithelzellen innerhalb von 4 h nicht mehr detektierbar. C_4-HSL hingegen war noch nach 8 h in geringen Mengen im Kulturüberstand nachweisbar (Chun, C. K. *et al.* 2004). Andere humane und nicht-humane Zellen, welche nicht von Lungenepithel abstammen, konnten hingegen 3oxoC_{12}-HSL und C_4-HSL nicht abbauen.

Zusammenfassend besitzen humane Epithelzellen, welche *in vivo* mit Pathogenen in Kontakt kommen, die Fähigkeit, Signalmoleküle abzubauen, wobei derzeit davon ausgegangen wird, dass es sich hier nicht um extrazelluläre sekretierte Moleküle handelt, die den Abbau möglich machen, sondern um zell-assoziierte Faktoren (Chun, C. K. *et al.* 2004).

D.2. Produktion und Verbreitung der AHL

Es wird davon ausgegangen, dass sich Autoinducer von Gram-negativen Bakterien (z.B. *P. aeruginosa*) in räumlich begrenzten Mikrokolonien und Biofilmen in sehr hohen Konzentrationen akkumulieren und so in kolonialisiertem Gewebe eine Wirkung erzielen können (Hense, B. A. *et al.* 2007). Darauf basierende Modellrechnungen der autoinduzierenden AHL-Produktion in Mikrokolonien haben ergeben, dass lokale Konzentrationen im millimolaren Bereich auftreten können (C. Kuttler und A. Hartmann, persönliche Mitteilung). Diese AHL-Mengen können in benachbartem Gewebe durchaus effektive Konzentrationen im Bereich von 60 µM erreichen, bevor der Abbauprozess durch Lactonasen zu einem starken so genannten „quenching“ des Signals führt.

In Studien war 3oxoC_{12}-HSL das in größter Menge vorkommende Signalmolekül in *in vitro*-Biofilmen, verglichen zu anderen AHL. Die gemessene Konzentration von 600 µM war höher, als in *P. aeruginosa* PAO1 Flüssigkulturen. In den Flüssigkulturen wurden Konzentrationen von 0,5-5 µM an 3oxoC_{12}-HSL gefunden, während von C_4-HSL

Konzentrationen zwischen 0,12-2,01 µM detektiert wurden (Pearson, J. P. *et al.* 1995; Reimmann, C. *et al.* 1997; Charlton, T. S. *et al.* 2000).

3oxoC_{12}-HSL diffundiert sehr schnell passiv in Jurkat-Zellen (T-Zellen) und auch in andere humane Zellen und Bakterien, um z.B. das LasR-LasI System zu aktivieren (Williams, S. C. *et al.* 2004). Die Datenlage ist diesbezüglich allerdings kontrovers: Andere Studien gehen von einem aktiven Transport durch die bakterielle Zellmembran aus (Pearson, J. P. *et al.* 1999). Der Unterschied dieser beiden Aussagen könnte darauf begründet sein, dass es *in vitro* zu einer unkontrollierten Aufnahme von 3oxoC_{12}-HSL in verschiedene humane Zelltypen kommt, während *in vivo* die Aufnahme ins Gewebe durch seine lipophile Struktur eingeschränkt ist (Wu, H. *et al.* 2004). Eine weitere Annahme besteht darin, dass 3oxoC_{12}-HSL in die Doppellipidschicht inseriert, wodurch die transmembranen Moleküle, wie z.B. der TZR, in ihrer Funktion gestört werden; dies könnte eine der Ursachen für die immunsuppressive Wirkung des Signalmoleküls darstellen. Fest steht, dass AHL jeglicher Kettenlänge in die humane Zelle eindringen können und dass dafür kein spezieller Rezeptor bekannt ist (Neddermann, P. *et al.* 2003; Williams, S. C. *et al.* 2004; Ritchie, A. J. *et al.* 2007).

Der Mechanismus der Aufnahme von Signalmolekülen in Lungenepithelzellen spielt eine wichtige Rolle in PatientInnen mit ZF, da Signalmoleküle und somit eine dichteabhängige Kommunikation zwischen Bakterien in chronisch infizierten ZF-Lungen nachgewiesen werden konnten (Middleton, B. *et al.* 2002). Im Sputum von ZF-PatientInnen wurden radiometrisch C_4-HSL und 3oxoC_{12}-HSL im pico-nanomolaren Bereich identifiziert (Singh, P. K. *et al.* 2000). Beide Signalmoleküle waren bioaktiv (n=23), wobei C_4-HSL weit weniger oft in ZF-PatientInnen nachgewiesen werden konnte, als 3oxoC_{12}-HSL (Erickson, D. L. *et al.* 2002). Des Weiteren wurde in ZF-PatientInnen im peripheren und bronchialen Lungengewebe (*ex vivo*) 104 pmol/g C_4-HSL (n=2) und 247 fmol/g 3oxoC_{12}-HSL (n=2) detektiert, während in den Kontrollgeweben von gesunden Menschen keine Signalmoleküle ermittelt werden konnten (Favre-Bonte, S. *et al.* 2002). Auch *Pseudomonas*-Stämme, welche von Beatmungsgeräten bzw. aus dem Beatmungsschlauch von intubierten PatientInnen (n=8) isoliert wurden, synthetisierten ebenso 3oxoC_{12}-HSL (n=8), mehr als C_4-HSL (n=6) (Favre-Bonte, S. *et al.* 2007).

Durch die semiquantitativen biochemischen Methoden sind große Unterschiede bei den Messungen der AHL zu erwarten, weil die Verteilung der Signalmoleküle innerhalb der Gewebe vermutlich sehr heterogen ist. Dies hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass *P. aeruginosa* im Lungengewebe nicht gleichmäßig verteilt vorkommt, sondern eingebettet in Biofilmen lokal angereichert ist.
Der große Konzentrationsunterschied an 3oxoC_{12}-HSL zwischen dem Sputum von ZF-PatientInnen, den *in vitro*-Biofilmen und den *P. aeruginosa* PAO1 Flüssigkulturen, könnte daraus resultieren, dass die *P. aeruginosa*-Stämme, welche die Lunge infizieren, weit weniger AHL produzieren, als die Laborstämme. Eine andere Erklärung könnte sein, dass die AHL im Sputum durch Wirtsenzyme schnell abgebaut werden und dies auch noch nach der Probennahme der Fall ist (Chun, C. K. *et al.* 2004; Yang, F. *et al.* 2005).

Im Mausmodell wurde gezeigt, dass C_4-HSL sich über die Blutbahnen und Blutgefäßwände hindurch verteilen kann, während dies bei 3oxoC_{12}-HSL nicht der Fall ist. Hier wird angenommen, dass es sich leichter über die Lymphbahnen ausbreitet und in *P. aeruginosa* infizierten ZF-PatientInnen von der Lunge aus über drainierende Lymphknoten verteilt wird und dadurch die systemischen Effekte hervorgerufen werden (Pritchard, D. I. *et al.* 2005). Der Einfluss von 3oxoC_{12}-HSL auf den Wirt ist jedoch deutlich von dessen Immunstatus abhängig.

In Vakzinierungsversuchen mit 3oxoC_{12}-HSL-BSA stiegen spezifische Antikörper im Serum der Mäuse deutlich an. Nach Infektion der Versuchstiere mit *P. aeruginosa* starben alle nicht-vakzinierten Kontrolltiere nach 2 Tagen, während 36% der immunisierten Mäuse am Tag 4 noch lebten. Die Bakterienzahlen in der Lunge unterschieden sich zwischen den zwei verschiedenen Versuchsgruppen nicht, wobei TNF-alpha bei den immunisierten Mäusen in wesentlich geringerem Umfang zu detektieren war. Die Menge an extrahiertem 3oxoC_{12}-HSL aus dem Serum und homogenisiertem Lungengewebe (*ex vivo*) war deutlich niedriger als in den nicht-vakzinierten Kontrolltieren (Miyairi, S. *et al.* 2006).
Klinische Studien mit ZF-PatientInnen zeigten, dass eine Makrolid Therapie über einen längeren Zeitraum die Zell-Zell Kommunikation von *P. aeruginosa* inhibiert (Tateda, K. *et al.* 2007). Allerdings müssen weitere Langzeitstudien durchgeführt werden, um hier den Nutzen des Medikaments zu belegen, bevor es im klinischen Alltag routinemäßig eingesetzt werden kann (Crosbie, P. A. *et al.* 2009).

D.3. Einfluss von AHL auf DZ

D.3.1. Expression von Oberflächenmarkern

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von verschiedenen AHL-Substanzen, speziell 3oxoC_{12}-HSL, auf die Funktion dendritischer Zellen getestet. Dafür wurden aus frisch entnommenem, peripherem Blut gesunder SpenderInnen die PBMZ gewonnen (Abschnitt B.3.17.1.). Bei den beschriebenen immunomagnetischen Methoden, die zur positiven oder negativen Selektion von $CD14^+$ Monozyten führen, ist ein großer Nachteil, dass die Monozyten durch Bindung ihrer Rezeptoren an die magnetischen Beads voraktiviert werden. Deshalb wurden in dieser Arbeit die Monozyten durch Plastikadhärenz isoliert (Abschnitt B.3.17.3.). Dabei trat allerdings der Nachteil auf, dass die aus Monozyten generierten DZ durch B- und T-Lymphozyten kontaminiert waren (de Almeida, M. C. *et al.* 2000). Das Populationsverhältnis war in den Versuchen sehr vom jeweiligen Spender abhängig und deshalb immer unterschiedlich. Die Thrombozyten wurden vor der Plastikadhärenz durch Zentrifugation entfernt, um zu verhindern, dass sie an die Monozyten binden und diese stimulieren (Weyrich, A. S. *et al.* 1996). Unreife DZ wurden nach dem Protokoll von Sallusto und Lanzavecchia unter Zugabe der Zytokine GM-CSF und IL-4 generiert (Abschnitt B.3.17.4.); dies stellt eine etablierte und vielfach angewandte Methode dar (Sallusto, F. *et al.* 1994; Kapsenberg, M. L. 2003). Die generierten, unreifen und reifen DZ (Tabelle B.15) stimmten in ihrer Morphologie und ihrem Phänotyp mit den beschriebenen DZ aus der Literatur überein (Thurner, B. *et al.* 1999; Zobywalski, A. *et al.* 2007). Auch der Anteil an $CD83^+$ DZ nach Stimulation mit LPS stimmte mit den Angaben, welche in der Literatur gemacht werden, überein (Romani, N. *et al.* 1996).

DZ sind für die Initiierung einer Immunantwort durch T-Zellen nötig. Im Gewebe befindliche DZ nehmen große Mengen an Antigen auf und wandern, nachdem sie entsprechende Signale erhalten haben, in die lokalen Lymphknoten aus. Dort aktivieren sie antigenspezifische naive T-Zellen durch Zytokinsignale und durch Interaktion ihrer Oberflächenmarker (CD80, CD86, CD40 und MHC Klasse I+II) mit den TZR (Banchereau, J. *et al.* 1998).

Wie in Abschnitt C.5. beschrieben, wurden durch Stimulation mit LPS und 3oxoC_{12}-HSL signifikant mehr Marker prozentual herabreguliert, als durch Kultivierung mit JC und dem

Signalmolekül (Abbildung C.5 und C.7). Beide Stimulationsansätze führten zu einem verminderten Prozentsatz an exprimierenden $CD83^+$, $CD80^+$, $CD86^+$ und HLA-DR^+ Zellen, wobei durch den Einfluss von LPS und 3oxoC_{12}-HSL zusätzlich noch CD40 und die Migrationsmarker CD184 und CD197 betroffen waren (Abbildung C.7). Dass prozentual mehr DZ positiv für die entsprechenden Oberflächenmarker unter Stimulation mit JC und 3oxoC_{12}-HSL waren, hängt vermutlich mit den schon beschriebenen Eigenschaften von JC zusammen, die DZ in höherem Maße zu aktivieren. Somit war bei gleicher Konzentration an eingesetztem Signalmolekül die Auswirkung auf den Prozentsatz der LPS-stimulierten Oberflächenmarker exprimierenden DZ größer. In Gegenwart von LPS und 3oxoC_{12}-HSL war die MFI bei $CD83^+$, $CD80^+$, $CD86^+$ $CD40^+$, $CD184^+$ und $CD197^+$ DZ ebenfalls geringer, als bei JC-stimulierten DZ (Abbildung C.6 und C.8). Bei LPS- und 3oxoC_{12}-HSL-stimulierten DZ war die MFI bei allen getesteten Oberflächenmolekülen, bei einigen sogar um mehr als die Hälfte im Vergleich zur Positivkontrolle vermindert.

In Studien mit 1 µg/ml LPS-stimulierten DZ, welche aus Blut isoliert wurden, zeigte sich eine Herabregulation des kostimulatorischen Moleküls CD86 nach Inkubation mit 100 µM 3oxoC_{12}-HSL für 24 h (Boontham, P. *et al.* 2008). In murinen DZ wurde nach Einwirkung von LPS (0,1 µg/ml) und 3oxoC_{12}-HSL (5-30 µM) eine Verminderung der MFI der Oberflächenmarker CD80, CD86 und CD40 exprimierenden DZ beobachtet. Die Expression von MHC Klasse II veränderte sich jedoch nicht. Die Kultivierung von LPS und C_4-HSL führte zu keinen Veränderungen im Expressionsmuster der murinen Zellen. Wie auch in Versuchen im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden konnte, veränderte die Zugabe von DMSO (0,1%) alleine, welches als Lösungsmittel für die Signalmoleküle verwendet wurde, die Funktion der Zellen nicht (Skindersoe, M. E. *et al.* 2009).

Wie in Abschnitt C.6. beschrieben, wurde in einigen Versuchen weder JC noch LPS zu den Kultivierungsansätzen zugegeben. Die untersuchten Oberflächenmarker HLA-A2, HLA-ABC und das Adhäsionsmolekül ICAM-1 wurden durch Einwirkung von 3oxoC_{12}-HSL nicht beeinflusst (Abbildung C.10). Der Grund hierfür ist möglicherweise darin zu sehen, dass 3oxoC_{12}-HSL nur in z.B. JC- bzw. LPS-induzierte Reifungsprozesse eingreift.
In der Literatur wird diskutiert, ob 3oxoC_{12}-HSL die Expression von Cyclooxygenasen (COX-2) durch die Aktivierung von NF-κB induziert. COX-2 spielt zum einen eine Rolle

bei inflammatorischen Prozessen, wie z.B. Fieber und Schmerzen (Smith, R. S. *et al.* 2002a) und zum anderen als Mediator einer pro-inflammatorischen Antwort durch Umwandlung von Arachidonsäure als Vorläufer von Serie-2 Prostanoiden (z.B. PGE_2) zu Beginn einer Entzündungsreaktion. Des Weiteren kann die Entzündungsreaktion durch COX-2 als Mediator wieder aufgelöst werden, indem andere anti-inflammatorische Prostaglandine (z.B. Cyclopentenon) gebildet werden (Gilroy, D. W. *et al.* 1999).
Prostaglandine steuern anti-inflammatorische Prozesse in verschiedenen Immunzellen. Dies beinhaltet die Inhibition der IL-2 Synthese von T-Zellen und die Herabregulation des Reifungsprozess der DZ und der IL-2 Produktion (Yang, F. *et al.* 2005; Klotz, L. *et al.* 2007). Ein anderes Prostaglandin (PGI_2), auch Prostacyclin genannt, inhibiert die TLR gesteuerte Aktivierung von DZ durch die MAP-Kinase und NF-κB Signalwege (Appel, S. *et al.* 2005). Die COX-2-Produktion von Lungen-Fibroblasten war durch den Einfluss von 3oxoC_{12}-HSL bis zu 35-fach erhöht, während die Expression von COX-1 sich nicht veränderte. Es wurde gezeigt, dass diese erhöhte Produktion durch 3oxoC_{12}-HSL induziert wurde, da das Signalmolekül die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB regulierte (Appel, S. *et al.* 2005). 3oxoC_{12}-HSL stimuliert ebenfalls eine vermehrte Produktion von PGE_2. Es kommt zu einer erhöhten Sekretion von Mucus, zur Gefäßerweiterung und Ödembildung in der Lunge. Die gesteigerte COX-2-Produktion und Expression von PGE_2 trägt zu einem Entzündungsprozess und der Lungenpathologie in ZF-PatientInnen bei, welche mit *P. aeruginosa* infiziert sind (Smith, R.S. *et al.* 2002b).
Der derzeitige Kenntnisstand kann folgendermaßen zusammengefasst werden: Der immunmodulatorische Effekt von 3oxoC_{12}-HSL beruht u.a. auf der Induktion der COX-2 Expression. Dies führt zur Produktion des pro-inflammatorischen Prostaglandins (PGE_2), welches die Th1-Antwort unterstützt oder zur Synthese von anti-inflammatorischen Prostacyclinen, welche eine Th2-Antwort verstärken und dazu führen, dass die DZ vermindert ausreifen (Hooi, D. S. *et al.* 2004).

D.3.2. Zytokinproduktion

Das sezernierte Zytokin- und Chemokinmuster der DZ wurde unter dem Einfluss von 3oxoC_{12}-HSL in Zellkulturüberständen untersucht, da das Signalmolekül die pro-inflammatorische Th1- oder humorale Th2-Antwort verschieben kann (Telford, G. *et al.*

1998; Ritchie, A. J. *et al.* 2003; Skindersoe, M. E. *et al.* 2009). Ein und dasselbe Chemokin bzw. Zytokin kann von unterschiedlichen Zellen sezerniert werden. Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Zytokine bzw. Chemokine in den Kulturüberständen wurden hauptsächlich von den DZ produziert. Da allerdings mit einer Mischpopulation, die aus DZ und kontaminierenden Lymphozyten bestand, gearbeitet wurde, kann davon ausgegangen werden, dass ein geringer Teil der Zytokine bzw. Chemokine auch von NK- und T-Zellen synthetisiert worden ist. IFN-gamma und Chemokine wie MIP-1alpha, MIP-1beta und IL-8 können z.B. von humanen NK-Zellen sezerniert werden (Banchereau, J. *et al.* 2000; Kim, C. H. 2004). Da der Anteil an $CD16^+$ Zellen von LPS-stimulierten DZ in Vorversuchen aber nur 4% betrug, war vermutlich die Beteiligung der NK-Zellen an der Zytokinproduktion nicht entscheidend. IFN-gamma wird ebenfalls von Th1-Effektorzellen und IL-13 von Th2-Effektorzellen sezerniert (de Jong, E. C. *et al.* 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde eine 2,5-fach höhere IL-13 Produktion unter Zugabe von JC und 3oxoC_{12}-HSL beobachtet (Abschnitt C.7.1., Abbildung C.11). Die IL-13 Zytokinproduktion der DZ, welche mit LPS und 3oxoC_{12}-HSL inkubiert wurden, war mit der Positivkontrolle zu vergleichen (Abschnitt C.7.2., Abbildung C.12). IFN-gamma Werte waren bei beiden Stimulationsansätzen unter dem Wert der Kontrolle. Es ist möglich, dass ein Teil der Sekretion dieser Zytokine von T-Zellen stammte und somit durch DZ induziert wurde. In der Literatur werden aber ebenso DZ-Subgruppen beschrieben, die diese Zytokine produzieren können (Banchereau, J. *et al.* 2000). Das entzündungshemmende Zytokin IL-10 wird sowohl von Treg, als auch von DZ produziert (Smits, H. H. *et al.* 2005). Im Fall der Kultivierung der DZ mit JC bzw. LPS und 3oxoC_{12}-HSL wurde um die Hälfte weniger IL-10 gebildet, als in der Positivkontrolle. Auch hier könnten die Treg einen Teil der Zytokinmenge produziert haben. *In vivo* wird die Polarisation der DZ durch unterschiedliche Zellen des Immunsystems und lösliche Faktoren beeinflusst. Deshalb könnte die Anwesenheit von Lymphozyten in den DZ-Kulturen *in vitro* die Polarisationsrichtung bzw. das Zytokinmuster der DZ nach JC- bzw. LPS-Stimulation in Ab- und Anwesenheit des Signalmoleküls noch verstärken. Eine Effektor-ZTL-Antwort, auf die später noch ausführlicher eingegangen wird, wurde in weiteren Experimenten untersucht, jedoch wurde hier auf die Stimulation der DZ mit JC bzw. LPS verzichtet.

In einer Reihe von Experimenten wurden bereits Einflüsse von 3oxoC_{12}-HSL auf die Zytokinproduktion von humanen Zellen beschrieben. Es war gezeigt worden, dass bei Aktivierung des TZR mit Anti-CD3-Antikörper und Anti-CD28-Antikörper von humanen

T-Zellen, 3oxoC_{12}-HSL in einer Konzentration von 50 µM die T-Zellproliferation und die IL-2 Sekretion inhibiert (Hooi, D. S. *et al.* 2004). Ritchie und Kollegen berichteten, dass 3oxoC_{12}-HSL die primäre und sekundäre antigenspezifische Zytokinantwort in nicht-lymphoiden Leukozyten und die Differenzierung der Th1 und Th2 Zellen vermindert (Ritchie, A. J. *et al.* 2005). Weiter war gezeigt worden, dass 3oxoC_{12}-HSL in den Konzentrationen 30-100 µM einen stimulierenden Effekt auf humane Atemwegsepithelzellen *in vitro* ausübte, so dass sie in erhöhtem Maße das Neutrophilen Chemokin IL-8 produzierten (DiMango, E. *et al.* 1995). In *in vitro*-Untersuchungen in humanen Fibroblasten und Epithelzellen wurde durch 3oxoC_{12}-HSL die Produktion von IL-8 stimuliert, wobei eine bestimmte DNA-Region und der Transkriptionsfakor NF-κB essentiell sind für die maximale Induktion der IL-8 Produktion (Smith, R. S. *et al.* 2001).
Humane DZ, welche in dieser Arbeit beschrieben werden, produzierten nach JC- bzw. LPS-Stimulation unter Einfluss von 3oxoC_{12}-HSL ebenfalls ca. die Hälfte mehr IL-8, verglichen zur positiven Kontrolle. Dies könnte vermutlich u.a. ein Grund dafür sein, warum es bei einer chronischen Besiedelung mit *P. aeruginosa* in der Lunge zu einem großen Influx von Neutrophilen kommt, welche das Lungengewebe in hohem Ausmaß zerstören. Des Weiteren inhibierte 3oxoC_{12}-HSL *in vitro* in einer Konzentration von > 30 µM die TNF-alpha und in einer Konzentration von > 0,1 µM die IL-12 Produktion von LPS-stimulierten murinen Makrophagen. Die Proliferation von Lymphozyten wurde ebenfalls herabreguliert. Das Signalmolekül 3oxoC_6-HSL konnte diese Effekte nicht erwirken (Telford, G. *et al.* 1998). Erst kürzlich zeigten LPS-gereifte murine DZ aus dem Knochenmark, welche in Anwesenheit von 3oxoC_{12}-HSL (5-30 µM) stimuliert worden waren, einen dosisabhängigen Rückgang in der Produktion von IL-12, ohne eine Veränderung in der IL-10 Sekretion zu zeigen (Skindersoe, M. E. *et al.* 2009). Boontham und Kollegen (2008) stimulierten generierte humane DZ mit 1 µg/ml LPS unter dem Einfluss von 3oxoC_{12}-HSL (100 µM). Danach wurden die AHL-behandelten DZ mit T-Zellen koinkubiert. In den Kulturüberständen zeigten sich erhöhte Mengen an IL-4 und IL-10 (anti-inflammatorische Th2-Antwort), während die TNF-alpha, IFN-gamma und IL-6 Sekretion (pro-inflammatorische Th1-Antwort) vermindert war (Boontham, P. *et al.* 2008).
In der vorliegenden Arbeit war die IL-12, TNF-alpha und IFN-gamma Produktion bei JC- bzw. LPS-stimulierten DZ durch 3oxoC_{12}-HSL ebenfalls vermindert. Die IL-10 Produktion war auch inhibiert, was im Widerspruch zu den aufgeführten Experimenten mit DZ aus murinem Knochenmark steht. Die IL-6 Synthese war bei beiden Stimulationsansätzen

unbeeinflusst. Da es sich bei den publizierten Ergebnissen jedoch z.T. um murine Modellsysteme handelt oder die experimentellen Ansätze verschiedenartig waren, können die Ergebnisse nicht ohne Weiteres miteinander verglichen werden.

In Gegenwart von 3oxoC_{12}-HSL in einer Konzentration von 50 µM kam es in murinen Makrophagen aus dem Knochenmark zu einer sehr deutlich verminderten Produktion des chemotaktischen Zytokins MIP-2, die unter Einwirkung von C_4-HSL nicht zu beobachten war. Eine Konzentration von nur 10 µM an 3oxoC_{12}-HSL im Kulturmedium führte dagegen schon zu einer enormen Reduktion der Produktion des Monozyten-Chemotaxisproteins (MCP-1) (Tateda, K. *et al.* 2003).
In der vorliegenden Arbeit wurde die Synthese des chemotaktischen Zytokins für Leukozyten MIP-1alpha durch Stimulation der humanen DZ mit JC und 3oxoC_{12}-HSL herabreguliert, was im Gegensatz zur erhöhten Produktion von IL-8 steht. Somit kann gefolgert werden, dass durch den Einfluss von 3oxoC_{12}-HSL die inflammatorische Antwort zu großen Teilen unterdrückt wird.
Bisher wurden nur die Effekte von 3oxoC_{12}-HSL diskutiert. Es ist aber ebenfalls zu berücksichtigen, dass auch die Signalmoleküle 3oxoC_4-HSL und C_{12}-HSL z.T. deutliche Einflüsse auf die Produktion von Zytokinen hatten. Es ist unklar, was die biologische Relevanz dieser Effekte ausmacht. Auswirkungen dieser Signalstoffe können jedoch auch einen Beitrag zur Modulation der Immunantwort haben.

D.3.3. Migrationsverhalten

Die Migration der DZ in sekundäre lymphoide Organe ist ein wichtiger Schritt, um die adaptive Immunantwort zu initiieren. Während der Reifung der DZ kommt es zur erhöhten Expression von Chemokinrezeptoren, die für die Migration essentiell sind, um die DZ in die regionären Lymphknoten zu dirigieren. *In vivo*- und *in vitro*-Studien zeigten, dass ohne die Hochregulation der Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR4 während der Reifung von murinen DZ aus dem Knochenmark keine Wanderung entlang eines CCL19 oder CXCL12 Gradienten in die lymphoiden Organe stattfindet (Villablanca, E. J. *et al.* 2008). Zusätzlich zu den hochregulierten CCR7 Chemokinrezeptoren nach Stimulation mit LPS auf den DZ

wurde ein zweites Signal, wie z.B. Stickoxid, als notwendig beschrieben, um eine Migration hin zu CCL19 zu bewirken (Giordano, D. *et al.* 2006).
Wie in Abschnitt C.8.1. beschrieben, wurde die gerichtete Wanderung der DZ entlang eines CXCL12 Gradienten, aber auch die spontane Wanderung nach Inkubation mit JC und 3oxoC_{12}-HSL leicht vermindert gefunden (Abbildung C.13), obwohl CXCR4 auf den DZ hochreguliert war und dies normalerweise zu einer Migration der DZ hätte führen sollen (Villablanca, E. J. *et al.* 2008). Allgemein wird durch Zugabe von PGE_2 ins Medium, welches im definierten JC enthalten ist, die Migration der DZ noch verstärkt (Rieser, C. *et al.* 1997).

Da mit zunehmender Anzahl durchgeführter statistischer Einzeltests die Wahrscheinlichkeit steigt, dass einzelne Tests zufällig Signifikanzen zeigen, wurde deshalb in dieser Arbeit strikt für multiples Testen korrigiert. Allerdings birgt dieses Verfahren des multiplen Testens das Risiko, relevante biologische Prozesse zu übersehen, die bei größerer Fallzahl oder besserem experimentellem Verfahren bei Korrektur für multiples Testen sichtbar geworden wären. Es kann daher bei Ergebnissen (z.B. Migrationsverhalten der AHL-behandelten DZ) die nach dem multiplen Testverfahren keinen signifikanten Effekt der AHL zeigten nicht ausgeschlossen werden, dass AHL hier doch wirksam waren.

In der Literatur sind bisher nur wenige Studien zu finden, die das Migrationsverhalten verschiedener Zellpopulationen unter Einfluss von 3oxoC_{12}-HSL beschreiben. In polymorphonuklearen Neutrophilen wurde gezeigt, dass eine Kultivierung mit *P. aeruginosa*-Überständen die Chemotaxis induzierte; diese chemotaktische Aktivierung wurde durch die Anwesenheit des Signalmoleküls 3oxoC_{12}-HSL in den Überständen hervorgerufen (Wagner, C. *et al.* 2007). In vorangegangenen *in vitro*-Studien wurde diese direkte Migration der PMN unter Einfluss von 100 µM 3oxoC_{12}-HSL, aber nicht von C_{12}-HSL oder anderen Signalmolekülen mit kürzerer Seitenkette, ebenfalls beschrieben. In diesem Fall war das chemotaktische Verhalten der Zellen unter Einfluss von 3oxoC_{12}-HSL mit dem einer chemotaktischen Rekrutierung durch IL-8 zu vergleichen (Zimmermann, S. *et al.* 2006).
Eine verminderte Migration der DZ in die lokalen Lymphknoten in der Lunge von ZF-PatientInnen durch den Einfluss von 3oxoC_{12}-HSL wäre von großem Vorteil für

P. aeruginosa, da dies zu einer eingeschränkten Aktivierung von T-Zellen führen würde und die Bakterien so vor einer Immunantwort weitestgehend geschützt wären.

D.3.4. Phagozytoseverhalten

Extrazelluläre Objekte, wie z.B. *P. aeruginosa*-Zellen, werden von den DZ über Phagozytose aufgenommen und liegen dann in Vesikeln (Phagosomen) vor. Für die Aufnahme des Bakteriums, muss *P. aeruginosa* an die Zelloberfläche des Phagozyten binden, wodurch die Reifung der antigenpräsentierenden Zelle induziert wird (Ishimoto, H. *et al.* 2008). Dies kann mittels antigenspezifischer Strukturen oder durch opsonierende Antikörper auf der Oberfläche des Pathogens geschehen.

In der Literatur gibt es kontroverse Meinungen darüber, ob eine Opsonierung von *P. aeruginosa* mit spezifischen Antikörpern zu einer erhöhten Phagozytose führt. Ein nicht-mucoider, ein mucoider *P. aeruginosa*-Stamm und *P. aeruginosa* PAO1 wurden nach Opsonierung mit normalem Serum (Komplement) von alveaolaren Makrophagen aus der Ratte minimal erhöht phagozytiert. Eine Opsonierung mit spezifischen *P. aeruginosa*-Antikörpern führte zu einer geringen Erhöhung der Phagozytose des nicht-mucoiden Stamms, während bei dem mucoiden Stamm die Phagozytoseleistung der Makrophagen um das 7-fache erhöht war (Krieg, D. P. *et al.* 1988). In Experimenten mit humanen Neutrophilen wurden FITC-markierte *Bordetella pertussis*-Bakterien ebenfalls um das 7-fache mehr phagozytiert, wenn diese vorher mit Antikörpern opsoniert wurden, im Gegensatz zu den nicht-opsonierten Kontrollbakterien (Weingart, C. L. *et al.* 1999). Andere Studien zeigten, dass mit angereicherten IgG Antikörpern aus Serum von ZF-PatientInnen prä-opsonierte *P. aeruginosa in vitro* von humanen alveolaren Makrophagen schlechter phagozytiert wurden, als unbehandelte Bakterien. In Funktionalitätsstudien der Fab- und Fc-Fragmente des IgG-Antikörpers stellte sich heraus, dass es zu einer beeinträchtigten Bindung des Antikörpers an den Fc-gamma Rezeptor des Makrophagen kam. *In vivo* könnte dies zu einer verbesserten Kolonisation des Respirationstrakts durch *P. aeruginosa* in ZF-PatientInnen führen (Fick, R. B., Jr. *et al.* 1981).
In der vorliegenden Arbeit wurden die verwendeten Pseudomonaden-Stämme mit Serum von ZF-PatientInnen prä-ospsoniert. Ein Vergleich mit nicht-opsonierten Bakterien wurde

nicht durchgeführt. Deshalb kann über eine verminderte oder erhöhte Phagozytosefähigkeit der DZ durch Opsonierung der Bakterien mittels Serum von ZF-PatientInnen keine Aussage gemacht werden.

Des Weiteren ist in der Literatur beschrieben, dass das Signalmolekül 3oxoC_{12}-HSL das Adhäsionsprotein beta2-Integrin CD11b/CD18 und einen IgG-Rezeptor an der Zelloberfläche von PMN hochreguliert hat, was zu einer erhöhten Phagozytose von opsonierten Bakterien durch PMN führte (Wagner, C. *et al.* 2007). Dieses Ergebnis bestätigte die Arbeiten von Vikström *et al.* (2005), in denen die Erhöhung der Phagozytose von *Saccharomyces cerevisiae* in Anwesenheit von 100 µM 3oxoC_{12}-HSL durch humane Makrophagen beschrieben wurde. Diese Aktivierung war allerdings deutlich von der eingesetzten Konzentration und der Inkubationsdauer des Signalmoleküls mit den Makrophagen abhängig. Längere Inkubationszeiten und geringere Konzentrationen erzielten diesen Effekt nicht. Die höheren Konzentrationen an Signalmolekülen könnten den Makrophagen helfen, die Biofilm-Formation von *P. aeruginosa* zu erkennen und durch das gesteigerte Phagozytoseverhalten zu unterbinden (Vikström, E. *et al.* 2005). Obwohl beide Zelltypen, PMN und Makrophagen, unterschiedliche Eigenschaften besitzen, waren sie offensichtlich beide in der Lage das Signalmolekül zu erkennen und darauf entsprechend mit einer erhöhten Phagozytoseaktivität zu reagieren (Wagner, C. *et al.* 2007).

Wie in Abschnitt B.1.7. beschrieben, wurden die für die Phagozytosetests verwendeten Pseudomonaden-Stämme fluoreszenz-markiert. In den bisher publizierten Studien wurde allerdings oft wenig darauf geachtet, die intrazelluläre Fluoreszenz von der Fluoreszenz auf der Zelloberfläche zu unterscheiden (Nuutila, J. *et al.* 2005). Um die extrazelluläre Fluoreszenz, welche von den an die Zellmembran der eukaryotischen Zelle gebundenen Pseudomonaden herrührte, für durchflusszytometrische Analysen auszulöschen, wurde in der vorliegenden Arbeit Trypanblau zugegeben. Die Farblösung löscht die extrazelluläre Fluoreszenz der frei schwimmenden und gebundenen Bakterien, wobei die durch die humanen Zellen internalisierten Partikel nicht beeinflusst werden. Diese Methode des so genannten „quenchen“ stellt ein sehr schnelles und präzises Verfahren dar, um die intrazelluläre Fluoreszenz, nicht aber die extrazelluläre Fluoreszenz, zu messen (Bjerknes, R. *et al.* 1984).

Die in Abschnitt C.9.2.1. gezeigten Ergebnisse belegen, dass die Phagozytosekapazität von Pseudomonaden-Stämmen in Gegenwart von 3oxoC_{12}-HSL durch humane DZ vermindert wurde (Abbildung C.16). Dies könnte aufgrund der optimierten Messanordnung mit der Nutzung von Trypanblau erstmals klar erfassbar gewesen sein.
Für *P. aeruginosa* wäre eine verminderte Phagozytoseaktivität von großem Nutzen, weil sich das Pathogen so der Vernichtung durch Immunzellen entziehen könnte und sein Überleben gesichert wäre.

D.3.5. T-Zellstimulationseigenschaften AHL-behandelter DZ

Die Aktivierung von T-Zellen setzt eine Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von Antigenen durch humane APZ und Expression von Adhäsionsmolekülen und kostimulatorischen Molekülen voraus.
Da der Prozentsatz an CD80, CD86 und HLA-DR auf den JC- bzw. LPS-stimulierten DZ durch den Einfluss von 3oxoC_{12}-HSL herabreguliert war (Abschnitt C.5.1.1., Abbildung C.5 und Abschnitt C.5.2.1., Abbildung C.7) und die Phagozytose von Bakterien durch die behandelten DZ ebenfalls vermindert war (Abschnitt C.9.2.1., Abbildung C.16), könnte die Präsentation der Antigene an T-Zellen beeinträchtigt sein. So wurde postuliert, dass die Erstinduktion (so genanntes „Priming“) von $CD4^+$ Zellen vermindert sein könnte und die 3oxoC_{12}-HSL behandelten DZ ein schlechter Stimulus für die T-Zellen wären. In diesem Fall würden die gegen *P. aeruginosa* gerichteten $CD4^+$ T-Zellantworten weniger gut unterstützt werden.

Ein T-Zellpriming wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt, ebenso wurde der Effekt der AHL auf die Prozessierung und die Präsentation von Antigen nicht untersucht. Dagegen wurden Versuche zur T-Zellstimulation von Effektor-T-Zellen durchgeführt (Abschnitt B.12.). Das T-Zellpriming wäre allerdings interessant zu messen, da dieses wesentlich von der Expression der kostimulatorischen Moleküle und Zytokinen, insbesondere IL-12 abhängig ist. Ebenso wäre es interessant, Antigenkreuzpräsentationstests mit speziellen Peptiden nach Bendz, H. *et al.* (2007) mit AHL-behandelten DZ durchzuführen, da in der vorliegenden Arbeit das Phagozytoseverhalten in Gegenwart von 3oxoC_{12}-HSL eingeschränkt war. So könnte möglicherweise die Makro- bzw. Mikropinozytose der DZ

unter Einfluss der AHL ebenfalls eingeschränkt sein und die Prozessierung und Präsentation des Peptidantigens wäre verändert.
Die Oberflächenmoleküle HLA-A2, HLA-ABC und ICAM-1 wurden auf unstimulierten HLA-$A2^+$ DZ bei Inkubation mit 3oxoC_{12}-HSL nicht vermindert exprimiert (Abschnitt C.6., Abbildung C.10). So wurde in dieser Arbeit die Beobachtung gemacht, dass nur unter stimulierten Bedingungen (in Anwesenheit von JC oder LPS) die Oberflächenmarker, wie z.B. MHC Klasse II, vermindert exprimiert wurden, während unter nicht-stimulierten Bedingungen (in Abwesenheit von JC oder LPS) keine Herabregulation von z.B. MHC Klasse I-Molekülen stattgefunden hatte.
Daraus kann gefolgert werden, dass 3oxoC_{12}-HSL nur einen Einfluss auf die Expression von Oberflächenmarkern auf den durch Reifung ausgelösten Induktionsprozess hat.

Konsistent mit dem Befund, dass die Expression der MHC Klasse I-Moleküle (HLA-A2 und HLA-ABC) und das Adhäsionsmolekül ICAM-1 nicht beeinflusst wurden, zeigte sich auch kein Effekt auf die HLA-abhängige Stimulation des alloreaktiven JB4-ZTL (Abschnitt C.10., Abbildung C.22).

In der Literatur wurde eine verminderte Induktion der T-Zellantwort durch 3oxoC_{12}-HSL behandelte DZ kürzlich von Boontham *et al.* (2008) beschrieben. Humane LPS-stimulierte DZ wurden, nach Inkubation mit 3oxoC_{12}-HSL, mit allogenspezifischen $CD3^+$ T-Lymphozyten kultiviert. Nach der gemeinsamen Inkubation der Zellen konnte eine Herabregulation der Aktivierung und Proliferation der T-Lymphozyten durch die DZ festgestellt werden (Boontham, P. *et al.* 2008). Auch Skindersoe und Kollegen konnten *in vitro* zeigen, dass nach Antigenstimulation von murinen LPS-gereiften DZ aus dem Knochenmark unter dem Einfluss von 3oxoC_{12}-HSL die T-Zellproliferation in geringerem Maße induziert wurde (Skindersoe, M. E. *et al.* 2009).

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse über den Einfluss von 3oxoC_{12}-HSL auf die Funktionen der DZ sind in Abbildung D.1 zusammengefasst.

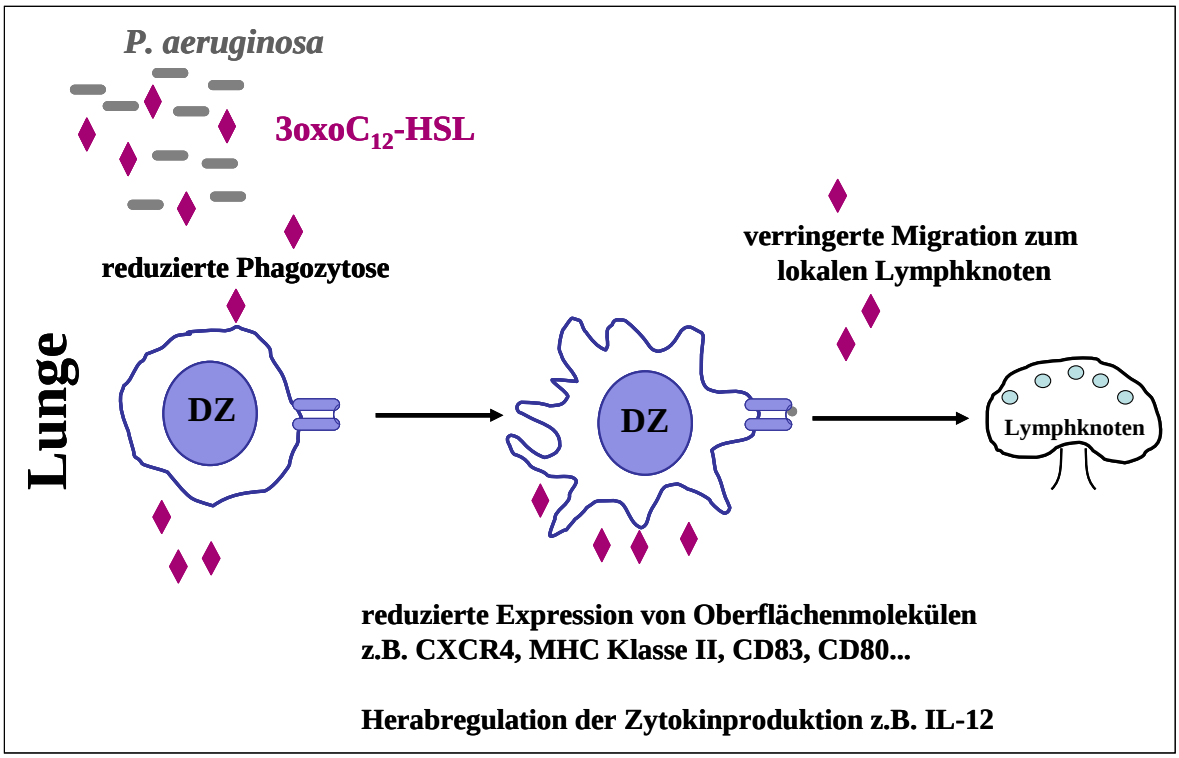


***Abbildung D.1*:** Einfluss von 3oxoC_{12}-HSL auf folgende Funktionen einer DZ: Phagozytose- und Migrationsfähigkeit, Expression von Maturations- und Migrationsmarkern und Zytokinproduktion.

Die herabregulierten Funktionen der DZ in Anwesenheit des Signalmoleküls 3oxoC_{12}-HSL könnten wesentlich dazu beitragen, dass *Pseudomonas aeruginosa* im Lungengewebe von ZF-PatientInnen durch Immunzellen nicht effizient eliminiert werden kann. Neue klinische Studien zeigten, dass die dichteabhängige Kommunikation durch Signalmoleküle von *P. aeruginosa* nach Verabreichung einer Chemotherapie mit einem Makrolid-Antibiotikum inhibiert werden kann. Bei diesem so genannten „Quorum quenching" handelt es sich um einen Prototyp eines möglichen Therapieansatzes für ZF-PatientInnen. Dennoch muss das Verständnis der molekularen Wirkmechanismen des Antibiotikums und der Einfluss der Signalmoleküle auf humane Zellen weiter verstärkt werden.

Deshalb wäre der nächste Schritt ein geeignetes Tiermodell zu entwickeln, um weitere detaillierte Experimente und Langzeitstudien in großem Umfang durchführen zu können (Übersicht in Tateda, K. *et al.* 2007 und Crosbie, P. A. J. *et al.* 2009).

E. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von 3oxoC_{12}-Homoserinlacton auf die Funktionen von dendritischen Zellen, welche die Schnittstelle zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem darstellen, untersucht werden. Dabei wurde der Effekt von 3oxoC_{12}-Homoserinlacton auf die Expression von Maturations- und Migrationsmarkern, die Zytokinproduktion, das Migrations- und Phagozytoseverhalten und die T-zellstimulierenden Eigenschaften der dendritischen Zellen in An- und Abwesenheit von Jonuleit Cocktail bzw. Lipopolysaccharid untersucht. Als Kontrolle für Oxo-Substitution bzw. Seitenkettenlänge dienten die Signalmoleküle 3oxoC_4-Homoserinlacton und C_{12}-Homoserinlacton. In Versuchen wurden toxische Effekte durch Überdosierung und Bioaktivitätsverluste der Signalmoleküle ausgeschlossen.

Durch Inkubation dendritischer Zellen mit Jonuleit Cocktail und 3oxoC_{12}-Homoserinlacton konnte mittels durchflusszytometrischen Analysen eine Herabregulation des Prozentsatzes der Oberflächenmarker CD80, CD86 und HLA-DR auf den dendritischen Zellen nachgewiesen werden.

Durch die Kultivierung der dendritischen Zellen mit Lipopolysaccharid und 3oxoC_{12}-Homoserinlacton wurden alle getesteten Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86, CD40, HLA-DR, CD184 und CD197 vermindert exprimiert. Die getesteten acylierten Homoserinlactone bewirkten ohne Stimulation der dendritischen Zellen mit Jonuleit Cocktail bzw. Lipopolysaccharid keine Herabregulation der Oberflächenmarker HLA-A2, HLA-ABC und ICAM-1. Demnach zeigte das Signalmolekül 3oxoC_{12}-Homoserinlacton nur bei Stimulation mit Jonuleit Cocktail bzw. Lipopolysaccharid einen Effekt auf die dendritischen Zellen.

Die Zytokinproduktion der dendritischen Zellen, welche durch einen Bio-Plex Pro™ Zytokintest analysiert wurde, war unter Einwirkung von 3oxoC_{12}-Homoserinlacton ebenfalls beeinflusst. Bei beiden Stimulationsansätzen (Jonuleit Cocktail + 3oxoC_{12}-Homoserinlacton und Lipopolysaccharid + 3oxoC_{12}-Homoserinlacton) wurde die Synthese der pro-inflammatorischen Zytokine (z.B. IL-12, TNF-alpha und IFN-gamma) und des entzündungshemmenden Zytokins IL-10 herabreguliert. Die Sekretion des entzündungsfördernden Zytokin IL-8 war bei beiden Ansätzen erhöht. Somit kann gefolgert werden, dass durch den Einfluss von 3oxoC_{12}-HSL die inflammatorische Antwort zu großen Teilen unterdrückt wird.

Das Migrationsverhalten der dendritischen Zellen wurde in Transwell® -Versuchen nach Stimulation mit Jonuleit Cocktail und 3oxoC_{12}-Homoserinlacton getestet. Die dendritischen Zellen zeigten eine verminderte gerichtete Migration entlang eines CXCL12 Gradienten. Die ungerichtete Spontanmigration der dendritischen Zellen wurde durch das Signalmolekül ebenfalls vermindert.

Die Phagozytoseaktivität der dendritischen Zellen wurde in Gegenwart von 3oxoC_{12}-Homoserinlacton getestet. Nach dem Quenchen der extrazellulären Fluoreszenz durch gebundene FITC-markierte Pseudomonaden mit Trypanblau-Lösung konnte mittels durchflusszytometrischen Analysen eine verminderte Phagozytose der fluoreszenzmarkierten Bakterien *Pseudomonas* spec. DSMZ 13134 und *Pseudomonas aeruginosa* P1E (Klinikisolat eines zystische Fibrose-Patienten) durch die dendritischen Zellen demonstriert werden. Mit Hilfe des Epifluoreszenz- und Laserscanning-Mikroskops und verschiedenen Färbemethoden konnten Phagolysosomen mit den enthaltenen fluoreszenzmarkierten Bakterien in den dendritischen Zellen sichtbar gemacht werden.

Durch allgemeine T-Zellstimulationstests wurde der Effekt von 3oxoC_{12}-Homoserinlacton auf die Fähigkeit der dendritischen Zellen, Effektor-T-Zellen zu stimulieren, getestet. Nach Kokultivierung der Signalmolekül-behandelten dendritischen Zellen (ohne Jonuleit Cocktail- bzw. Lipopolysaccharid-Stimulation) mit den zytotoxischen T-Zellen JB4 wurde die IFN-gamma Konzentration in den Kulturüberständen mittels ELISA gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass die 3oxoC_{12}-Homoserinlacton-Behandlung die Eigenschaften der dendritischen Zellen zur Stimulation von Effektor-T-Zellen nicht beeinflusst.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse eine Herabregulation der Funktion der dendritischen Zelle auf mehreren Ebenen. Dies könnte einer der Gründe sein, warum *Pseudomonas aeruginosa* in zystische Fibrose PatientInnen nicht eliminiert werden kann. In klinischen Studien wurde durch die Gabe von Makrolid-Antibiotikum die dichteabhängige Kommunikation der Bakterien in z.B. Biofilmen inhibiert. Für eine genauere Untersuchung der molekularen Mechanismen der Signalmoleküle und der Makrolid-Antibiotika wäre der Einsatz eines Tiermodells der nächste Schritt.

SUMMARY

The aim of this doctoral thesis was to examine signal formation, cytokine production, migration, phagocytosis and the ability of effector T cell-stimulation of human monocyte-derived dendritic cells under the influence of 3oxoC_{12}-homoserine lactone (in presence or absence of Jonuleit Cocktail or lipopolysaccharide). 3oxoC_4-homoserine lactone and C_{12}-homoserine lactone were used as controls for the oxo-substitution as well as for chain length of 3oxoC_{12}-homoserine lactone. Toxic effects of 3oxoC_{12}-homoserine lactone on dendritic cells and loss of bioactivity of the signaling molecules were excluded for the applied concentration of the autoinducers.

Analysis of the maturation and migration markers using flow cytometry after treatment with Jonuleit Cocktail and 3oxoC_{12}-homoserine lactone of dendritic cells showed a decreased percentage of CD80, CD86 and HLA-DR expressing dendritic cells. Cultivation with lipopolysaccharide and 3oxoC_{12}-homoserine lactone significantly decreased the percentage of CD83, CD80, CD86, CD40, HLA-DR, CD184 and CD197. Homoserine lactone-treatment of dendritic cells without Jonuleit Cocktail or lipopolysaccharide and with 3oxoC_{12}-homoserine lactone did not affect the expression of HLA-A2, HLA-ABC and ICAM-1 molecules by dendritic cells. Thus, 3oxoC_{12}-homoserine lactone influences only stimulated dendritic cells.

To determine the effects of 3oxoC_{12}-homoserine lactone on soluble signals generated by Jonuleit Cocktail or lipopolysaccharide matured dendritic cells, a number of cyto/chemokines were quantified in cell culture supernatants. Treatment with 3oxoC_{12}-homoserine lactone and Jonuleit Cocktail or lipopolysaccharide led to the downregulation of pro-inflammatory cytokines like IL-12, TNF-alpha und IFN-gamma and the anti-inflammatory cytokine IL-10. The secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-8 was upregulated in both cases. These data indicated that 3oxoC_{12}-homoserine lactone may influence the Th1-Th2 balance in the infected host.

The migratory capacity of dendritic cells, matured in the presence of 3oxoC_{12}-homoserine lactone, was tested in Transwell®-migration assays. During their maturation under the influence of 3oxoC_{12}-homoserine lactone, dendritic cells highly upregulate CXCR4 on their surface. Although the chemokine receptors were upregulated, migration towards CXCL12 was significantly less. Spontaneous migration without stimulation by CXCL12 was also inhibited.

The phagocytic capacitiy of dendritic cells in the presence of 3oxoC_{12}-homoserine lactone was tested in phagocytosis assays. After quenching the extracellular fluorescence of labeled *Pseudomonas* strains with trypan blue, intracellular fluorescence of phagocytosed bacteria was analysed via flow cytometry. *Pseudomonas* spec. DSMZ 13134 and *Pseudomonas aeruginosa* P1E (isolated from a cystic fibrosis patient) were less ingested by dendritic cells incubated with 3oxoC_{12}-homoserine lactone. Phagolysosomes inside the dendritic cells were analysed with different staining methods and epifluorescence- or laser scanning microscopy.
The capacity of dendritic cells treated with 3oxoC_{12}-homoserine lactone (without Jonuleit Cocktail or lipopolysaccharide) to stimulate effector T-cells was tested with common T-cell-assays. After cocultivation of dendritic cells with JB4 cytotoxic T-cells IFN-gamma concentration in the culture supernatant was measured via ELISA. The quality of the 3oxoC_{12}-homoserine lactone treated dendritic cells to stimulate effector T-cells was not affected.

In summary, the results showed a downregulation of the functions of dendritic cells, which could be one of the reasons, why *Pseudomonas aeruginosa* cannot be destroyed efficiently by the immune system of the cystic fibrosis host. Evidence from clinical trials suggests that macrolides may be a prototype of bacterial quorum sensing inhibitors. Characterization of the molecular mechanisms and structure-activity correlation for both, homoserine lactone-signaling molecules and macrolides, may be a promising subject for future research and could be accomplished by a corresponding animal model.

F. LITERATUR

Abbas, A. K., Murphy, K. M. & Sher, A. (1996): Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383** (6603): 787-793.

Albus, A. M., Pesci, E. C., Runyen-Janecky, L. J., West, S. E. & Iglewski, B. H. (1997): Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **179** (12): 3928-3935.

Anzai, Y., Kim, H., Park, J. Y., Wakabayashi, H. & Oyaizu, H. (2000): Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol* **50** (4): 1563-1589.

Appel, S., Mirakaj, V., Bringmann, A., Weck, M. M., Grunebach, F. & Brossart, P. (2005): PPAR-gamma agonists inhibit toll-like receptor-mediated activation of dendritic cells via the MAP kinase and NF-kappaB pathways. *Blood* **106** (12): 3888-3894.

Balough, K., McCubbin, M., Weinberger, M., Smits, W., Ahrens, R. & Fick, R. (1995): The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* **20** (2): 63-70.

Baltimore, R. S., Cross, A. S. & Dobek, A. S. (1987): The inhibitory effect of sodium alginate on antibiotic activity against mucoid and non-mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **20** (6): 815-823.

Banchereau, J. & Steinman, R. M. (1998): Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392** (6673): 245-252.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B. & Palucka, K. (2000): Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**: 767-811.

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

Bauer, W. D. & Mathesius, U. (2004): Plant responses to bacterial quorum sensing signals. *Curr Opin Plant Biol* **7** (4): 429-433.

Bear, C. E., Li, C. H., Kartner, N., Bridges, R. J., Jensen, T. J., Ramjeesingh, M. & Riordan, J. R. (1992): Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell* **68** (4): 809-818.

Bennett, W. E. & Cohn, Z. A. (1966): The isolation and selected properties of blood monocytes. *J Exp Med* **123** (1): 145-160.

Bendz, H., Ruhland, S. C., Pandya, M. J., Hainzl, O., Riegelsberger, S., Brauchle, C., Mayer, M. P., Buchner, J., Issels, R. D. & Noessner, E. (2007): Human heat shock protein 70 enhances tumor antigen presentation through complex formation and intracellular antigen delivery without innate immune signaling. *J Biol Chem* **282** (43): 31688-31702.

Bertani, G. (1951): Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62** (3): 293-300.

Bjerknes, R. & Bassoe, C. F. (1984): Phagocyte C3-mediated attachment and internalization: flow cytometric studies using a fluorescence quenching technique. *Blut* **49** (4): 315-323.

Bonten, M. J., Bergmans, D. C., Speijer, H. & Stobberingh, E. E. (1999): Characteristics of polyclonal endemicity of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in intensive care units. Implications for infection control. *Am J Respir Crit Care Med* **160** (4): 1212-1219.

Boontham, P., Robins, A., Chandran, P., Pritchard, D., Camara, M., Williams, P., Chuthapisith, S., McKechnie, A., Rowlands, B. J. & Eremin, O. (2008): Significant immunomodulatory effects of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules: possible link in human sepsis. *Clin Sci (Lond)* **115** (11): 343-351.

Boucher, R. C., Stutts, M. J., Knowles, M. R., Cantley, L. & Gatzy, J. T. (1986): Na^+ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation. *J Clin Invest* **78** (5): 1245-1252.

Boucher, R. C. (2002): An overview of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Adv Drug Deliv Rev* **54** (11): 1359-1371.

Bragonzi, A., Worlitzsch, D., Pier, G. B., Timpert, P., Ulrich, M., Hentzer, M., Andersen, J. B., Givskov, M., Conese, M. & Doring, G. (2005): Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* expresses alginate in the lungs of patients with cystic fibrosis and in a mouse model. *J Infect Dis* **192** (3): 410-419.

Campana, S., Taccetti, G., Ravenni, N., Masi, I., Audino, S., Sisi, B., Repetto, T., Doring, G. & de Martino, M. (2004): Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a cystic fibrosis center. *J Cyst Fibros* **3** (3): 159-163.

Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J. & Lanzavecchia, A. (1997): Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* **388** (6644): 782-787.

Charlton, T. S., de Nys, R., Netting, A., Kumar, N., Hentzer, M., Givskov, M. & Kjelleberg, S. (2000): A novel and sensitive method for the quantification of *N*-3-oxoacyl homoserine lactones using gas chromatography-mass spectrometry: application to a model bacterial biofilm. *Environ Microbiol* **2** (5): 530-541.

Chhabra, S. R., Harty, C., Hooi, D. S., Daykin, M., Williams, P., Telford, G., Pritchard, D. I. & Bycroft, B. W. (2003): Synthetic analogues of the bacterial signal (quorum sensing) molecule *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone as immune modulators. *J Med Chem* **46** (1): 97-104.

Chun, C. K., Ozer, E. A., Welsh, M. J., Zabner, J. & Greenberg, E. P. (2004): Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** (10): 3587-3590.

Cooley, M., Chhabra, S. R. & Williams, P. (2008): *N*-Acylhomoserine lactone-mediated quorum sensing: a twist in the tail and a blow for host immunity. *Chem Biol* **15** (11): 1141-1147.

Crosbie, P. A. & Woodhead, M. A. (2009): Long-term macrolide therapy in chronic inflammatory airway diseases. *Eur Respir J* **33** (1): 171-181.

Davis, P. B. (2006): Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med* **173** (5): 475-482.

de Almeida, M. C., Silva, A. C., Barral, A. & Barral Netto, M. (2000): A simple method for human peripheral blood monocyte isolation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **95** (2): 221-223.

de Jong, E. C., Smits, H. H. & Kapsenberg, M. L. (2005): Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol* **26** (3): 289-307.

de Kievit, T., Seed, P. C., Nezezon, J., Passador, L. & Iglewski, B. H. (1999): RsaL, a novel repressor of virulence gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181** (7): 2175-2184.

Deretic, V. (2008): Autophagosome and phagosome. *Methods Mol Biol* **445**: 1-10.

Diggle, S. P., Winzer, K., Lazdunski, A., Williams, P. & Camara, M. (2002): Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of *N*-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. *J Bacteriol* **184** (10): 2576-2586.

DiMango, E., Zar, H. J., Bryan, R. & Prince, A. (1995): Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. *J Clin Invest* **96** (5): 2204-2210.

Dorwart, M., Thibodeau, P. & Thomas, P. (2004): Cystic fibrosis: recent structural insights. *J Cyst Fibros* **3** (Suppl. 2): 91-94.

Eberl, L. & Tummler, B. (2004): *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: genome evolution, interactions and adaptation. *Int J Med Microbiol* **294** (2-3): 123-131.

Englmann, M., Fekete, A., Kuttler, C., Frommberger, M., Li, X., Gebefugi, I., Fekete, J. & Schmitt-Kopplin, P. (2007): The hydrolysis of unsubstituted *N*-acylhomoserine lactones to their homoserine metabolites. Analytical approaches using ultra performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* **1160** (1-2): 184-193.

Erickson, D. L., Endersby, R., Kirkham, A., Stuber, K., Vollman, D. D., Rabin, H. R., Mitchell, I. & Storey, D. G. (2002): *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems may control virulence factor expression in the lungs of patients with cystic fibrosis. *Infect Immun* **70** (4): 1783-1790.

Eschbach, M., Schreiber, K., Trunk, K., Buer, J., Jahn, D. & Schobert, M. (2004): Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *J Bacteriol* **186** (14): 4596-4604.

Fanger, N. A., Wardwell, K., Shen, L., Tedder, T. F. & Guyre, P. M. (1996): Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J Immunol* **157** (2): 541-548.

Farrar, J. D., Asnagli, H. & Murphy, K. M. (2002): T helper subset development: roles of instruction, selection, and transcription. *J Clin Invest* **109** (4): 431-435.

Favre-Bonte, S., Pache, J. C., Robert, J., Blanc, D., Pechere, J. C. & van Delden, C. (2002): Detection of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals in lung tissue of cystic fibrosis patients. *Microb Pathog* **32** (3): 143-147.

Favre-Bonte, S., Chamot, E., Kohler, T., Romand, J. A. & van Delden, C. (2007): Autoinducer production and quorum-sensing dependent phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* vary according to isolation site during colonization of intubated patients. *BMC Microbiol* **7**: 33.

Feltman, H., Schulert, G., Khan, S., Jain, M., Peterson, L. & Hauser, A. R. (2001): Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **147** (10): 2659-2669.

Fick, R. B., Jr., Naegel, G. P., Matthay, R. A. & Reynolds, H. Y. (1981): Cystic fibrosis *Pseudomonas* opsonins. Inhibitory nature in an in vitro phagocytic assay. *J Clin Invest* **68** (4): 899-914.

Fuqua, C., Winans, S. C. & Greenberg, E. P. (1996): Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* **50**: 727-751.

Gilroy, D. W., Colville-Nash, P. R., Willis, D., Chivers, J., Paul-Clark, M. J. & Willoughby, D. A. (1999): Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med* **5** (6): 698-701.

Giordano, D., Magaletti, D. M. & Clark, E. A. (2006): Nitric oxide and cGMP protein kinase (cGK) regulate dendritic-cell migration toward the lymph-node-directing chemokine CCL19. *Blood* **107** (4): 1537-1545.

Govan, J. R. & Deretic, V. (1996): Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* **60** (3): 539-574.

Hartl, D., Latzin, P., Hordijk, P., Marcos, V., Rudolph, C., Woischnik, M., Krauss-Etschmann, S., Koller, B., Reinhardt, D., Roscher, A. A., Roos, D. & Griese, M. (2007): Cleavage of CXCR1 on neutrophils disables bacterial killing in cystic fibrosis lung disease. *Nat Med* **13** (12): 1423-1430.

Hassett, D. J. (1996): Anaerobic production of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*: alginate restricts diffusion of oxygen. *J Bacteriol* **178** (24): 7322-7325.

Hense, B. A., Kuttler, C., Muller, J., Rothballer, M., Hartmann, A. & Kreft, J. U. (2007): Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? *Nat Rev Microbiol* **5** (3): 230-239.

Hertz, C. J., Kiertscher, S. M., Godowski, P. J., Bouis, D. A., Norgard, M. V., Roth, M. D. & Modlin, R. L. (2001): Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. *J Immunol* **166** (4): 2444-2450.

Heufler, C., Koch, F., Stanzl, U., Topar, G., Wysocka, M., Trinchieri, G., Enk, A., Steinman, R. M., Romani, N. & Schuler, G. (1996): Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol* **26** (3): 659-668.

Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A. & Ezekowitz, R. A. (1999): Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284** (5418): 1313-1318.

Hoiby, N., Krogh Johansen, H., Moser, C., Song, Z., Ciofu, O. & Kharazmi, A. (2001): *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. *Microbes Infect* **3** (1): 23-35.

Hooi, D. S., Bycroft, B. W., Chhabra, S. R., Williams, P. & Pritchard, D. I. (2004): Differential immune modulatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules. *Infect Immun* **72** (11): 6463-6470.

Horikawa, M., Tateda, K., Tuzuki, E., Ishii, Y., Ueda, C., Takabatake, T., Miyairi, S., Yamaguchi, K. & Ishiguro, M. (2006): Synthesis of *Pseudomonas* quorum-sensing autoinducer analogs and structural entities required for induction of apoptosis in macrophages. *Bioorg Med Chem Lett* **16** (8): 2130-2133.

Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S. & Steinman, R. M. (1992): Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* **176** (6): 1693-1702.

Inaba, K., Turley, S., Iyoda, T., Yamaide, F., Shimoyama, S., Reis e Sousa, C., Germain, R. N., Mellman, I. & Steinman, R. M. (2000): The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J Exp Med* **191** (6): 927-936.

Ishimoto, H., Yanagihara, K., Araki, N., Mukae, H., Sakamoto, N., Izumikawa, K., Seki, M., Miyazaki, Y., Hirakata, Y., Mizuta, Y., Yasuda, K. & Kohno, S. (2008): Single-cell observation of phagocytosis by human blood dendritic cells. *Jpn J Infect Dis* **61** (4): 294-297.

Ito, T., Amakawa, R. & Fukuhara, S. (2002): Roles of toll-like receptors in natural interferon-producing cells as sensors in immune surveillance. *Hum Immunol* **63** (12): 1120-1125.

Janeway, C. A., Travers, P. & Walport, M. (2009): Immunologie. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin-Oxford* 7. Auflage.

Jarrossay, D., Napolitani, G., Colonna, M., Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. (2001): Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* **31** (11): 3388-3393.

Jonuleit, H., Kuhn, U., Muller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J. & Enk, A. H. (1997): Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* **27** (12): 3135-3142.

Kalinski, P., Hilkens, C. M., Wierenga, E. A. & Kapsenberg, M. L. (1999): T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* **20** (12): 561-567.

Kapsenberg, M. L. (2003): Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* **3** (12): 984-993.

Kerem, B., Rommens, J. M., Buchanan, J. A., Markiewicz, D., Cox, T. K., Chakravarti, A., Buchwald, M. & Tsui, L. C. (1989): Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* **245** (4922): 1073-1080.

Kerrigan, A. M. & Brown, G. D. (2009): C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology* **214** (7): 562-575.

Kim, C. H. (2004): Chemokine-chemokine receptor network in immune cell trafficking. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* **4** (4): 343-361.

King, E. O., Ward, M. K. & Raney, D. E. (1954): Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J Lab Clin Med* **44** (2): 301-307.

Klotz, L., Dani, I., Edenhofer, F., Nolden, L., Evert, B., Paul, B., Kolanus, W., Klockgether, T., Knolle, P. & Diehl, L. (2007): Peroxisome proliferator-activated receptor gamma control of dendritic cell function contributes to development of $CD4^+$ T cell anergy. *J Immunol* **178** (4): 2122-2131.

Knowles, M. R. & Boucher, R. C. (2002): Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest* **109** (5): 571-577.

Kravchenko, V. V., Kaufmann, G. F., Mathison, J. C., Scott, D. A., Katz, A. Z., Grauer, D. C., Lehmann, M., Meijler, M. M., Janda, K. D. & Ulevitch, R. J. (2008): Modulation of gene expression via disruption of NF-kappaB signaling by a bacterial small molecule. *Science* **321** (5886): 259-263.

Krieg, D. P., Helmke, R. J., German, V. F. & Mangos, J. A. (1988): Resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to nonopsonic phagocytosis by alveolar macrophages in vitro. *Infect Immun* **56** (12): 3173-3179.

Lechmann, M., Zinser, E., Golka, A. & Steinkasserer, A. (2002): Role of CD83 in the immunomodulation of dendritic cells. *Int Arch Allergy Immunol* **129** (2): 113-118.

Lewenza, S., Visser, M. B. & Sokol, P. A. (2002): Interspecies communication between *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Can J Microbiol* **48** (8): 707-716.

Luthi, E., Mercenier, A. & Haas, D. (1986): The arcABC operon required for fermentative growth of *Pseudomonas aeruginosa* on arginine: Tn5-751-assisted cloning and localization of structural genes. *J Gen Microbiol* **132** (10): 2667-2675.

Lyczak, J. B., Cannon, C. L. & Pier, G. B. (2002): Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* **15** (2): 194-222.

MacDonald, K. P., Munster, D. J., Clark, G. J., Dzionek, A., Schmitz, J. & Hart, D. N. (2002): Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* **100** (13): 4512-4520.

Mahenthiralingam, E., Campbell, M. E. & Speert, D. P. (1994): Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect Immun* **62** (2): 596-605.

McAuley, D. F. & Elborn, J. S. (2000): Cystic fibrosis: basic science. *Paediatr Respir Rev* **1** (2): 93-100.

McKnight, S. L., Iglewski, B. H. & Pesci, E. C. (2000): The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182** (10): 2702-2708.

Medzhitov, R. (2001): Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* **1** (2): 135-145.

Middleton, B., Rodgers, H. C., Camara, M., Knox, A. J., Williams, P. & Hardman, A. (2002): Direct detection of *N*-acylhomoserine lactones in cystic fibrosis sputum. *FEMS Microbiol Lett* **207** (1): 1-7.

Miyairi, S., Tateda, K., Fuse, E. T., Ueda, C., Saito, H., Takabatake, T., Ishii, Y., Horikawa, M., Ishiguro, M., Standiford, T. J. & Yamaguchi, K. (2006): Immunization with 3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone-protein conjugate protects mice from lethal *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *J Med Microbiol* **55** (10): 1381-1387.

Murray, T. S., Egan, M. & Kazmierczak, B. I. (2007): *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonization in cystic fibrosis patients. *Curr Opin Pediatr* **19** (1): 83-88.

Neddermann, P., Gargioli, C., Muraglia, E., Sambucini, S., Bonelli, F., De Francesco, R. & Cortese, R. (2003): A novel, inducible, eukaryotic gene expression system based on the quorum-sensing transcription factor TraR. *EMBO Rep* **4** (2): 159-165.

Nseir, S., Di Pompeo, C., Pronnier, P., Beague, S., Onimus, T., Saulnier, F., Grandbastien, B., Mathieu, D., Delvallez-Roussel, M. & Durocher, A. (2002): Nosocomial tracheobronchitis in mechanically ventilated patients: incidence, aetiology and outcome. *Eur Respir J* **20** (6): 1483-1489.

Nuutila, J. & Lilius, E. M. (2005): Flow cytometric quantitative determination of ingestion by phagocytes needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells. *Cytometry A* **65** (2): 93-102.

O'Hagan, D. T. & Valiante, N. M. (2003): Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat Rev Drug Discov* **2** (9): 727-735.

O'Malley, C. A. (2009): Infection control in cystic fibrosis: cohorting, cross-contamination, and the respiratory therapist. *Respir Care* **54** (5): 641-657.

Ochsner, U. A. & Reiser, J. (1995): Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** (14): 6424-6428.

Passador, L., Cook, J. M., Gambello, M. J., Rust, L. & Iglewski, B. H. (1993): Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* **260** (5111): 1127-1130.

Pearson, J. P., Gray, K. M., Passador, L., Tucker, K. D., Eberhard, A., Iglewski, B. H. & Greenberg, E. P. (1994): Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (1): 197-201.

Pearson, J. P., Passador, L., Iglewski, B. H. & Greenberg, E. P. (1995): A second *N*-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** (5): 1490-1494.

Pearson, J. P., Van Delden, C. & Iglewski, B. H. (1999): Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* **181** (4): 1203-1210.

Pesci, E. C., Pearson, J. P., Seed, P. C. & Iglewski, B. H. (1997): Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **179** (10): 3127-3132.

Pritchard, D. I., Todd, I., Brown, A., Bycroft, B. W., Chhabra, S. R., Williams, P. & Wood, P. (2005): Alleviation of insulitis and moderation of diabetes in NOD mice following treatment with a synthetic *Pseudomonas aeruginosa* signal molecule, *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Acta Diabetol* **42** (3): 119-122.

Qureshi, S. T., Lariviere, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K. J., Gros, P. & Malo, D. (1999): Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* **189** (4): 615-625.

Rajan, S. & Saiman, L. (2002): Pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *Semin Respir Infect* **17** (1): 47-56.

Reimmann, C., Beyeler, M., Latifi, A., Winteler, H., Foglino, M., Lazdunski, A. & Haas, D. (1997): The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer *N*-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Mol Microbiol* **24** (2): 309-319.

Reis e Sousa, C., Sher, A. & Kaye, P. (1999): The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. *Curr Opin Immunol* **11** (4): 392-399.

Riedel, K., Hentzer, M., Geisenberger, O., Huber, B., Steidle, A., Wu, H., Hoiby, N., Givskov, M., Molin, S. & Eberl, L. (2001): *N*-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology* **147** (12): 3249-3262.

Rieser, C., Bock, G., Klocker, H., Bartsch, G. & Thurnher, M. (1997): Prostaglandin E2 and tumor necrosis factor alpha cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of interleukin 12 production. *J Exp Med* **186** (9): 1603-1608.

Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J. L. & et al. (1989): Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245** (4922): 1066-1073.

Ritchie, A. J., Yam, A. O., Tanabe, K. M., Rice, S. A. & Cooley, M. A. (2003): Modification of in vivo and in vitro T- and B-cell-mediated immune responses by the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Infect Immun* **71** (8): 4421-4431.

Ritchie, A. J., Jansson, A., Stallberg, J., Nilsson, P., Lysaght, P. & Cooley, M. A. (2005): The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule *N*-3-(oxododecanoyl)-L-homoserine lactone inhibits T-cell differentiation and cytokine production by a mechanism involving an early step in T-cell activation. *Infect Immun* **73** (3): 1648-1655.

Ritchie, A. J., Whittall, C., Lazenby, J. J., Chhabra, S. R., Pritchard, D. I. & Cooley, M. A. (2007): The immunomodulatory *Pseudomonas aeruginosa* signalling molecule *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone enters mammalian cells in an unregulated fashion. *Immunol Cell Biol* **85** (8): 596-602.

Romani, N., Reider, D., Heuer, M., Ebner, S., Kampgen, E., Eibl, B., Niederwieser, D. & Schuler, G. (1996): Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* **196** (2): 137-151.

Rommens, J. M., Iannuzzi, M. C., Kerem, B., Drumm, M. L., Melmer, G., Dean, M., Rozmahel, R., Cole, J. L., Kennedy, D., Hidaka, N. & et al. (1989): Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* **245** (4922): 1059-1065.

Rossi, M. & Young, J. W. (2005): Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol* **175** (3): 1373-1381.

Sabroe, I. & Whyte, M. K. (2007): Incapacitating the immune system in cystic fibrosis. *Nat Med* **13** (12): 1417-1418.

Sadikot, R. T., Blackwell, T. S., Christman, J. W. & Prince, A. S. (2005): Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* **171** (11): 1209-1223.

Sahlin, S., Hed, J. & Rundquist, I. (1983): Differentiation between attached and ingested immune complexes by a fluorescence quenching cytofluorometric assay. *J Immunol Methods* **60** (1-2): 115-124.

Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. (1994): Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* **179** (4): 1109-1118.

Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. & Lanzavecchia, A. (1995): Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* **182** (2): 389-400.

Schuhegger, R., Ihring, A., Gantner, S., Bahnweg, G., Knappe, C., Vogg, G., Hutzler, P., Schmid, M., Van Breusegem, F., Eberl, L., Hartmann, A. & Langebartels, C. (2006): Induction of systemic resistance in tomato by *N*-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant Cell Environ* **29** (5): 909-918.

Schuster, M., Lostroh, C. P., Ogi, T. & Greenberg, E. P. (2003): Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol* **185** (7): 2066-2079.

Schwarzmann, S. & Boring, J. R. (1971): Antiphagocytic Effect of Slime from a Mucoid Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **3** (6): 762-767.

Seta, N. & Kuwana, M. (2007): Human circulating monocytes as multipotential progenitors. *Keio J Med* **56** (2): 41-47.

Shen, Z., Reznikoff, G., Dranoff, G. & Rock, K. L. (1997): Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J Immunol* **158** (6): 2723-2730.

Shortman, K. & Liu, Y. J. (2002): Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* **2** (3): 151-161.

Singh, P. K., Schaefer, A. L., Parsek, M. R., Moninger, T. O., Welsh, M. J. & Greenberg, E. P. (2000): Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* **407** (6805): 762-764.

Skindersoe, M. E., Zeuthen, L. H., Brix, S., Fink, L. N., Lazenby, J., Whittall, C., Williams, P., Diggle, S. P., Froekiaer, H., Cooley, M. & Givskov, M. (2009): *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules interfere with dendritic cell-induced T-cell proliferation. *FEMS Immunol Med Microbiol* **55** (3): 335-345.

Smith, R. S., Fedyk, E. R., Springer, T. A., Mukaida, N., Iglewski, B. H. & Phipps, R. P. (2001): IL-8 production in human lung fibroblasts and epithelial cells activated by the *Pseudomonas* autoinducer *N*-3-oxododecanoyl homoserine lactone is transcriptionally regulated by NF-kappa B and activator protein-2. *J Immunol* **167** (1): 366-374.

Smith, R. S., Harris, S. G., Phipps, R. & Iglewski, B. (2002a): The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule *N*-(3-oxododecanoyl)-homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation in vivo. *J Bacteriol* **184** (4): 1132-1139.

Smith, R. S., Kelly, R., Iglewski, B. H. & Phipps, R. P. (2002b): The *Pseudomonas* autoinducer *N*-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 production in human lung fibroblasts: implications for inflammation. *J Immunol* **169** (5): 2636-2642.

Smits, H. H., de Jong, E. C., Wierenga, E. A. & Kapsenberg, M. L. (2005): Different faces of regulatory DCs in homeostasis and immunity. *Trends Immunol* **26** (3): 123-129.

S**piers, A. J., Buckling, A. & Rainey, P. B.** (2000): The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology* **146** (10): 2345-2350.

Steidle, A., Allesen-Holm, M., Riedel, K., Berg, G., Givskov, M., Molin, S. & Eberl, L. (2002): Identification and characterization of an *N*-acylhomoserine lactone-dependent quorum-sensing system in *Pseudomonas putida* strain IsoF. *Appl Environ Microbiol* **68** (12): 6371-6382.

Steinbrink, K., Paragnik, L., Jonuleit, H., Tuting, T., Knop, J. & Enk, A. H. (2000): Induction of dendritic cell maturation and modulation of dendritic cell-induced immune responses by prostaglandins. *Arch Dermatol Res* **292** (9): 437-445.

Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. (1973): Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* **137** (5): 1142-1162.

Steinman, R. M., Inaba, K., Turley, S., Pierre, P. & Mellman, I. (1999): Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Hum Immunol* **60** (7): 562-567.

Stutts, M. J., Canessa, C. M., Olsen, J. C., Hamrick, M., Cohn, J. A., Rossier, B. C. & Boucher, R. C. (1995): CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* **269** (5225): 847-850.

Takeda, K., Kaisho, T. & Akira, S. (2003): Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* **21**: 335-376.

Tateda, K., Ishii, Y., Horikawa, M., Matsumoto, T., Miyairi, S., Pechere, J. C., Standiford, T. J., Ishiguro, M. & Yamaguchi, K. (2003): The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer *N*-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. *Infect Immun* **71** (10): 5785-5793.

Tateda, K., Ishii, Y., Kimura, S., Horikawa, M., Miyairi, S. & Yamaguchi, K. (2007): Suppression of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems by macrolides: a promising strategy or an oriental mystery? *J Infect Chemother* **13** (6): 357-367.

Telford, G., Wheeler, D., Williams, P., Tomkins, P. T., Appleby, P., Sewell, H., Stewart, G. S., Bycroft, B. W. & Pritchard, D. I. (1998): The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect Immun* **66** (1): 36-42.

Thery, C. & Amigorena, S. (2001): The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol* **13** (1): 45-51.

Thurner, B., Roder, C., Dieckmann, D., Heuer, M., Kruse, M., Glaser, A., Keikavoussi, P., Kampgen, E., Bender, A. & Schuler, G. (1999): Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J Immunol Methods* **223** (1): 1-15.

Thurnher, M., Zelle-Rieser, C., Ramoner, R., Bartsch, G. & Holtl, L. (2001): The disabled dendritic cell. *FASEB J* **15** (6): 1054-1061.

Trinchieri, G., Pflanz, S. & Kastelein, R. A. (2003): The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* **19** (5): 641-644.

Tummler, B. & Kiewitz, C. (1999): Cystic fibrosis: an inherited susceptibility to bacterial respiratory infections. *Mol Med Today* **5** (8): 351-358.

Vander Wauven, C., Pierard, A., Kley-Raymann, M. & Haas, D. (1984): *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. *J Bacteriol* **160**: 928-934.

Vikström, E., Magnusson, K. E. & Pivoriunas, A. (2005): The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone stimulates phagocytic activity in human macrophages through the p38 MAPK pathway. *Microbes Infect* **7** (15): 1512-1518.

Villablanca, E. J., Zhou, D., Valentinis, B., Negro, A., Raccosta, L., Mauri, L., Prinetti, A., Sonnino, S., Bordignon, C., Traversari, C. & Russo, V. (2008): Selected natural and synthetic retinoids impair CCR7- and CXCR4-dependent cell migration in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol* **84** (3): 871-879.

Vukmanovic-Stejic, M., Vyas, B., Gorak-Stolinska, P., Noble, A. & Kemeny, D. M. (2000): Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. *Blood* **95** (1): 231-240.

Wagner, V. E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A. I. & Iglewski, B. H. (2003): Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J Bacteriol* **185** (7): 2080-2095.

Wagner, C., Zimmermann, S., Brenner-Weiss, G., Hug, F., Prior, B., Obst, U. & Hansch, G. M. (2007): The quorum-sensing molecule *N*-3-oxododecanoyl homoserine lactone (3OC12-HSL) enhances the host defence by activating human polymorphonuclear neutrophils (PMN). *Anal Bioanal Chem* **387** (2): 481-487.

Weingart, C. L., Broitman-Maduro, G., Dean, G., Newman, S., Peppler, M. & Weiss, A. A. (1999): Fluorescent labels influence phagocytosis of *Bordetella pertussis* by human neutrophils. *Infect Immun* **67** (8): 4264-4267.

Weyrich, A. S., Elstad, M. R., McEver, R. P., McIntyre, T. M., Moore, K. L., Morrissey, J. H., Prescott, S. M. & Zimmerman, G. A. (1996): Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J Clin Invest* **97** (6): 1525-1534.

Whiteley, M., Bangera, M. G., Bumgarner, R. E., Parsek, M. R., Teitzel, G. M., Lory, S. & Greenberg, E. P. (2001): Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* **413** (6858): 860-864.

Williams, S. C., Patterson, E. K., Carty, N. L., Griswold, J. A., Hamood, A. N. & Rumbaugh, K. P. (2004): *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer enters and functions in mammalian cells. *J Bacteriol* **186** (8): 2281-2287.

Wilson, R. & Dowling, R. B. (1998): Lung infections. 3. *Pseudomonas aeruginosa* and other related species. *Thorax* **53** (3): 213-219.

Worlitzsch, D., Tarran, R., Ulrich, M., Schwab, U., Cekici, A., Meyer, K. C., Birrer, P., Bellon, G., Berger, J., Weiss, T., Botzenhart, K., Yankaskas, J. R., Randell, S., Boucher, R. C. & Doring, G. (2002): Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* **109** (3): 317-325.

Wozniak, D. J., Wyckoff, T. J., Starkey, M., Keyser, R., Azadi, P., O'Toole, G. A. & Parsek, M. R. (2003): Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** (13): 7907-7912.

Wu, H., Song, Z., Hentzer, M., Andersen, J. B., Molin, S., Givskov, M. & Hoiby, N. (2004): Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *J Antimicrob Chemother* **53** (6): 1054-1061.

Yang, X. Y., Wang, L. H., Chen, T., Hodge, D. R., Resau, J. H., DaSilva, L. & Farrar, W. L. (2000): Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT. *J Biol Chem* **275** (7): 4541-4544.

Yates, E. A., Philipp, B., Buckley, C., Atkinson, S., Chhabra, S. R., Sockett, R. E., Goldner, M., Dessaux, Y., Camara, M., Smith, H. & Williams, P. (2002): *N*-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **70** (10): 5635-5646.

Zabner, J., Smith, J. J., Karp, P. H., Widdicombe, J. H. & Welsh, M. J. (1998): Loss of CFTR chloride channels alters salt absorption by cystic fibrosis airway epithelia in vitro. *Mol Cell* **2** (3): 397-403.

Zimmermann, S., Wagner, C., Muller, W., Brenner-Weiss, G., Hug, F., Prior, B., Obst, U. & Hansch, G. M. (2006): Induction of neutrophil chemotaxis by the quorum-sensing molecule *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Infect Immun* **74** (10): 5687-5692.

Zobywalski, A., Javorovic, M., Frankenberger, B., Pohla, H., Kremmer, E., Bigalke, I. & Schendel, D. J. (2007): Generation of clinical grade dendritic cells with capacity to produce biologically active IL-12p70. *J Transl Med* **5**: 18.

Zumft, W. G. (1997): Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* **61** (4): 533-616.

Publikation

Binder, T. & Bernatowicz, R., Noessner, E., Rothballer, M., Schmid, M., Griese, M., Schendel, D. J., Hartmann, A. & Krauss-Etschmann, S.: The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer *N*-(3-oxododecanoyl)-HSL inhibits dendritic cell functions. (In Vorbereitung)

Vortrag

Hartmann, A., Binder, T., Bernatowicz, R., Fekete, A., Schmid, M., Schmitt-Kopplin, P., Durner, J. & Krauss-Etschmann, S. (2010): Response of plants and human immune cells to bacterial quorum sensing molecules of the *N*-(acyl)-homoserinelactone type. Jahrestagung der Vereinigung für allgemeine und angewandte Mikrobiologie (VAAM) und der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Hannover, Deutschland.

Poster

Binder, T., Bernatowicz, R., Noessner, E., Rothballer, M., Schmid, M., Schendel, D. J., Hartmann, A. & Krauss-Etschmann, S. (2009): The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer *N*-(3-oxododecanoyl)-HSL inhibits dendritic cell functions. 9th Annual Meeting of the Federation of Clinical Immunology Socienties (FOCIS), San Francisco, CA, USA.

Binder, T., Bernatowicz, R., Noessner, E., Rothballer, M., Schmid, M., Schendel, D. J., Hartmann, A. & Krauss-Etschmann, S. (2009): Das Homoserinlacton *N*-(3-oxododecanoyl) von *Pseudomonas aeruginosa* inhibiert die Funktion humaner dendritischer Zellen. 31. Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie e.V., Düsseldorf, Deutschland.

Bernatowicz, R., Binder, T., Schneider, A., Schendel, D. J., Hartmann, A. & Krauss-Etschmann, S. (2008): Effects of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule *N*-(3-oxododecanoyl)-homoserinelactone on human dendritic cells. Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies (ÖGAI, DGfI), Wien, Österreich.

Binder, T., Bernatowicz, R., Rothballer, M., Schmid, M., Krauss-Etschmann, S., Schendel, D. J. & Hartmann, A. (2007): Quantitation of live versus dead probiotic bacteria. 37th Annual Meeting of the German Society for Immunology, Heidelberg, Deutschland.

Schneider, A., Binder, T., Bernatowicz, R., Zobywalski, A., Falk, C., Hartmann, A., Schendel, D. J. & Krauss-Etschmann, S. (2007): Modulation of human dendritic cells by UV-inactivated and live probiotic bacteria. 37th Annual Meeting of the German Society for Immunology, Heidelberg, Deutschland.

Schneider, A., Zobywalski, A., Buddrus, K., Binder, T., Shadid, S., James, L., Falk, C., Hartmann, A., Schendel, D. J. & Krauss-Etschmann, S. (2006): Modulation of human dendritic cells by seven different probiotic strains. 1st Joint Meeting of European National Societies of Immunology, 16th European Congress of Immunology, Paris, Frankreich.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich folgenden Personen sehr herzlich danken:

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Anton Hartmann, für die Überlassung des interessanten Themas, für die große Unterstützung und Freiheit bezüglich meiner Arbeit, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes für unvorhersehbar lange Zeit, für seine Hilfsbereitschaft bei allen Problemen und für seinen Glauben an die Fertigstellung dieser Arbeit.

Der Leiterin der klinischen Kooperationsgruppe, Frau PD Dr. Susanne Krauss-Etschmann, für die beachtliche Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit, für die Chance einen großen Teil meiner Arbeit in ihrer Gruppe machen zu können, für die ständig Diskussionsbereitschaft und für die wertvollen Anregungen.

Frau Prof. Dr. Dr. Weiß für die Erstellung des Zweitgutachtens und bei allen anderen Mitgliedern der Prüfungskommission.

Dem AMP-Arbeitsgruppenleiter, Dr. Michael Schmid, für seine Großzügigkeit bei der Beschaffung aller gewünschten Materialien, für die freundschaftlichen Gespräche, für die Hilfe bei meiner Arbeit und für das Lösen etlicher Computerprobleme.

Dr. Michael Rothballer für seine außerordentliche Bereitschaft zu helfen, für seine aufmunternde und motivierende Art und für seine wertvollen Tipps. Für seine große Unterstützung bei der Handhabung der Mikroskope, bei allen Problematiken rund um die Bakterien und bei unzähligen wissenschaftlichen Fragen.

Meiner AMP-Arbeitsgruppe: Dr. Katharina Buddrus-Schiemann, Doreen Fischer, Andreas Hofmann, Dan Li und Angelika Schulz für jegliche Hilfe, für die unkomplizierte, lustige und überaus freundliche Arbeitsatmosphäre.
Katharina für den hervorragenden Start 2004 im Stübchen, für die aufmunternden Gespräche, für die Bereitstellung ihres GFP-markierten Proradix-„Viehs“, für ihre Hilfe bei diesem Werk und dafür, dass sie immer für mich da war (Wir werden siegen!).
Doreen für die Unterstützung beim Auszählen diverser Bakterienstämme; Doreen und Andreas für den Spaß und für die guten, alten Erinnerungen.

Meiner KKG-Arbeitsgruppe: Inge Müller, Nikola Schulz, Rodica Bernatowicz, Sandra Zimmermann, Susanne Harner, Gabriele Heilig und Cornelia Dalibor für das hilfreiche, aufbauende und sehr gute Arbeitsklima.
Meiner 1a HiWine Rodica, für ihre große Hilfe bei meiner Arbeit, für ihre Zuverlässigkeit und für ihre unkomplizierte, sympathische Art!
Dr. Ingi, Nikl und noch mal Rodl für die tolle und immer überaus freundschaftliche Arbeitsatmosphäre im LaBüro, für die vielen Lacher und für die anregenden und meist hitzigen, natürlich hochwissenschaftlichen Debatten über Gott und die Welt.

Der ehemaligen Doktorandin aus der klinischen Kooperationsgruppe, Dr. Anastasia Schneider, für die ausführliche und aufopfernde Einarbeitung in die Geheimnisse der Zellkultur.

Der Leiterin des Instituts für molekulare Immunologie, Prof. Dr. Dolores J. Schendel, für das Korrekturlesen meiner Abstracts, für die Unterstützung und für die wertvollen Tipps für meine Arbeit.

Der ganzen Arbeitsgruppe Tumorimmunologie (Institut für molekulare Immunologie) für die Hilfsbereitschaft, besonders der Arbeitsgruppenleiterin PD Dr. Elfriede Nössner für das kurzweilige Bereitstellen eines Arbeitsplatzes, für die kompetente Beantwortung unzähliger Fragen und das Korrekturlesen meiner Arbeit. Sowie Anna Brandl für die engagierte, unermüdliche Unterstützung für das Gelingen meiner Versuche und für ihre Freundlichkeit.

Prof. Dr. Matthias Griese vom Dr. von Haunerschen Kinderspital für das Bereitstellen des Serums von ZF-PatientInnen und des *P. aeruginosa* P1E Klinikisolats.

Allen Ehemaligen, insbesondere Dr. Ricardo Yara und Dr. Soumitra Paul Chouwdhury für einen guten Anfang, für die tolle Hilfsbereitschaft und die Einblicke in fremde Religionen und Gebräuche. Dr. Rania Shadid für ihre aufmunternde und nette Art. Stefanie Rohrer für eine kurze, aber dennoch unvergesslich gute Zeit im Labor, für das Korrekturlesen meiner Arbeit und für die wundervolle Freundschaft!

Dr. Mirjam Franz aus dem Kubus für die Hilfestellung am CLSM.

Rita Meilbeck aus dem onkologisch-hämatologischen Labor II und dem Satelliten-Labor für die Unterstützung bei der Pappenheim-Färbung.

Meiner Familie, meinen Freunden, meinen Helfern und Schutzengeln für ihre immerwährende Fürsorge, für die zahlreichen Aufmunterungen und die gewaltige Unterstützung bei all meinen Vorhaben – ohne sie wäre ich nicht so weit gekommen!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Tatiana Binder
geboren am 02.04.1975 in Heilbronn

Promotion

11/2004-07/2009 (Auszeit von insg. 2 Jahren)	Promotion an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) in München, Department Biologie 1, Bereich Mikrobiologie; durchgeführt am Helmholtz Zentrum München in Neuherberg, Abteilung Mikroben-Pflanzen Interaktionen unter der Leitung von Prof. Dr. Anton Hartmann, Arbeitsgruppe Mikrobiologie der Wurzel, in Kooperation mit dem Dr. von Haunerschen Kinderspital in München (LMU), Klinische Kooperationsgruppe „Immunregulation im Kindesalter“ unter der Leitung von PD Dr. Susanne Krauss-Etschmann

Studium

07/2004	Abschluss als Diplom-Biologin (Univ.) mit dem Prädikat „sehr gut“
03/2003/-07/2004 (Auszeit von 6 Monaten)	Diplomarbeit: „Analyse der Sekundärstoffbildung des antarktischen *Streptomyces*-Stammes NTK 97“ (Note: 1,0)
10/2001-02/2003 (Auszeit von 6 Monaten)	Fortsetzung des Hauptstudiengangs
09/2000-04/2001 (2 Freisemester)	Auslandsstudium an der Montana State University in Bozeman (MT, USA)
07/1998-07/2000	Hauptstudiengang Mikrobiologie mit den Nebenfächern Parasitologie und Medizinische Mikrobiologie & Hygiene
07/1998	Vordiplom in Biologie
10/1996-07/1998	Grundstudium der Biologie an der Eberhard-Karls Universität in Tübingen

Schulbildung

08/1992-07/1996	Ernährungswissenschaftliches Gymnasium in Heilbronn
08/1985-06/1992	Heinrich von Kleist Realschule in Heilbronn