

Technische Universität München

Institut für Umweltmedizin UNIKA-T

(Direktorin: Univ.-Prof. Dr. C. I. Traidl-Hoffmann)

**Immunmodulatorische Wirkung von Sexualhormonen  
in der primären Immunantwort**

David Patrick Greiner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. C. I. Traidl-Hoffmann

2. Univ.-Prof. Dr. T. Biedermann

Die Dissertation wurde am 16.12.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.09.2015 angenommen.

# **I Inhaltsverzeichnis**

<b>Kapitel</b>	<b>Titel</b>	<b>Seite</b>
<b>II</b>	<b>Verzeichnis der veröffentlichten Daten aus der Arbeit</b>	<b>3</b>
<b>III</b>	<b>Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen</b>	<b>4</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1	Überblick	6
1.2	Atopische Erkrankungen	7
1.3	Theoretische Grundlagen	9
1.3.1	Dendritische Zellen	9
1.3.2	T-Lymphozyten	11
1.3.3	Sexualhormone	13
1.4	Sexualhormone und atopische Erkrankungen	16
<b>2.</b>	<b>Ziel der Arbeit</b>	<b>18</b>
<b>3.</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>20</b>
3.1	Materialien	20
3.1.1	Probanden	20
3.1.2	Biologisches Material	20
3.1.3	Antikörper, Zytokine, Kits	21
3.1.4	Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Geräte	23
3.1.5	Verwendete Medien	27
3.2	Methoden	28
3.2.1	Herstellung der Hormonstocklösungen ( $10^{-2}M$ ) in Ethanol absolute	28
3.2.2	Zellkultur	28
3.2.2.1	Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMC)	28
3.2.2.2	Isolierung von Monozyten	29
3.2.2.3	Generierung Dendritischer Zellen	29
3.2.2.4	Stimulation Dendritischer Zellen mit Sexualhormonen	29
3.2.2.5	Allogener Lymphozytenstimulationstest	30
3.2.3	Durchflusszytometrie	33
3.2.3.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	33
3.2.3.2	Intrazelluläre Färbung der Hormonrezeptoren auf Dendritischen Zellen	34
3.2.3.3	Analyse des Phänotyps und der Vitalität Dendritischer Zellen	34
3.2.3.4	Intrazytoplasmatische Zytokinfärbung in T-Zellen	35
3.2.4	Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	36
3.2.5	Proliferationsmessung	38
3.2.6	Statistische Analyse	39
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
4.1	Etablierung des Zellkultursystems	40
4.1.1	Etablierung des hormonreduzierten Kultursystems	40
4.1.2	Einfluss des Lösungsmittels Ethanol	45
4.2	Expression von Sexualhormonrezeptoren auf Dendritischen Zellen	48
4.3	Direkte Effekte von Sexualhormonen auf Dendritische Zellen	48
4.3.1	Effekte von Sexualhormonen auf das Oberflächenrezeptorprofil Dendritischer Zellen	48
4.3.2	Effekte von Sexualhormonen auf die Zytokinsekretion Dendritischer Zellen	51

<b>Kapitel</b>	<b>Titel</b>	<b>Seite</b>
4.4	Allogener Lymphozytenstimulationstest	55
4.4.1	Indirekte Effekte von Sexualhormonen auf T-Gedächtniszellen	55
4.4.2	Indirekte Effekte von Sexualhormonen auf die Differenzierung von naiven T-Zellen	61
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>66</b>
5.1	Einfluss des hormonreduzierten Kultursystems	66
5.2	Direkte Effekte von Sexualhormonen auf Dendritische Zellen	71
5.3	Allogener Lymphozytenstimulationstest	74
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>79</b>
<b>IV</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>81</b>
<b>V</b>	<b>Dank</b>	<b>90</b>
<b>VI</b>	<b>Anhang</b>	<b>91</b>

## **II Verzeichnis der veröffentlichten Daten aus der Arbeit**

Vorträge auf Kongressen:

**D. Greiner**, K. Eyerich, S. Gilles, J. Ring, H. Behrendt, W. Chen, C. Traidl-Hoffmann

Th1- and Th17-differentiation is supported by female sex hormones

22. Mainzer Allergie-Workshop, Deutsche Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie e.V. (DGAKI), Mainz 11. - 12. März 2010

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert. Projektnummer 2868/10 Hormon-assoziierte Geschlechtsunterschiede bei allergischen Erkrankungen: bedingt durch Th17-Zellen?

### III Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

%	Prozent
Abb.	Abbildung
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Differentiation
Cpm	counts per minute
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamine-tetraacetic acid
ELISA	Enzym Linked Immunosorbent Assay
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage colony stimulating factor
DZ	Dendritische Zelle
E2	17 $\beta$ -Estradiol
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FSC	Forward Scatter
FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	fluorescein
g	Gravitation
HLA	Human Leukocyte Antigen
HuDZ Medium	Humanes Dendritisches Zell Medium
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbeccos Medium
LPS	lipopolysaccharide
M	Mol pro Liter
MACS	Magnetically Activated Cell Sorting
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MHC	Major histocompatibility complex
ml	Milliliter
MLR	mixed leukocyte reaction
MoDZ	Monozyten-abgeleitete Dendritische Zelle
$\mu$ l	Mikroliter
ng	Nanogramm

nM	Nanomolar
PBMC	Periphere blood mononuclear cells
pg	Pikogramm
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
Rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
s	Sekunde
SEM	Standard mean of error
SSC	Side Scatter
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor beta
Th1	T-Helferzelle vom Typ 1
Th2	T-Helferzelle vom Typ 2
Th9	T-Helferzelle vom Typ 9
Th17	T-Helferzelle vom Typ 17
Th22	T-Helferzelle vom Typ 22
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
Treg	Regulatorische T-Zelle
U	Unit

# 1. Einleitung

## 1.1 Überblick

Atopische Erkrankungen wie Asthma bronchiale und atopisches Ekzem kommen weltweit immer häufiger vor und besitzen einen hohen sozioökonomischen Stellenwert (Papadopoulos et al. 2012).

Die Pathogenese dieser Erkrankungen basiert dabei auf einem komplexen Zusammenspiel aus genetischer Prädisposition, Umweltfaktoren und dem Sozialverhalten.

In diesem Kontext konnten epidemiologische Studien einen eindeutigen Zusammenhang zwischen Hormonstatus und Ausprägung atopischer Erkrankungen nachweisen:

Jungen unter 16 Jahren leiden häufiger unter Asthma bronchiale als gleichaltrige Mädchen. Nach der Pubertät kehrt sich dieses Verhältnis um: Frauen sind nicht nur häufiger, sondern auch schwerer betroffen (Almqvist et al. 2008, Jensen-Jarolim et al. 2008). Auch das atopische Ekzem kommt bei Jungen vor der Pubertät häufiger vor und betrifft nach der Pubertät mehr Frauen (Chen et al. 2008, Harrop et al. 2007, Mohrenschlager et al. 2006). Diese epidemiologischen Beobachtungen lassen vermuten, dass die Geschlechtshormone in der Pathogenese von Asthma und atopischem Ekzem sehr wahrscheinlich eine Rolle spielen.

Interessanterweise basieren schwer ausgeprägtes Asthma und atopisches Ekzem häufig auf einer starken Th17-Immunantwort, die mit erhöhter Sekretion von Interleukin-17 und Interleukin-22 und damit einer Rekrutierung von Immunzellen und einer komplexen Immunreaktion durch Epithelzellen einhergeht (Cavani et al. 2012, Eyerich et al. 2009, Nembrini et al. 2009). In diesem Zusammenhang spielen auch Th1-Zellen eine Rolle, indem sie eine wichtige Aufgabe in der Chronifizierung dieser Erkrankungen übernehmen (Bieber et al. 2008, Rebane et al. 2012, Trautmann et al. 2002).

Ziel dieser Arbeit soll es sein, den Einfluss der weiblichen Geschlechtshormone 17 $\beta$ -Estradiol und Progesteron und des wichtigsten männlichen Geschlechtshormons Testosteron auf die Achse zwischen Dendritischen Zellen und T-Zellen, insbesondere Th17- und Th1-Zellen, zu beleuchten.

Im Folgenden wird zunächst auf die Klinik und die Pathogenese von atopischen Erkrankungen eingegangen. Anschließend werden theoretische Grundlagen zu Dendritischen Zellen, T-Zellen und Sexualhormonen dargestellt.

Zuletzt werden Hypothesen zum Einfluss von Sexualhormonen auf atopische Erkrankungen vorgestellt.

## 1.2 Atopische Erkrankungen

Unter Atopie (aus dem griechischen a-topos = falsch platziert) versteht man eine familiär auftretende Neigung zur Entwicklung bestimmter Krankheiten, die oft mit Allergien verbunden sind: Zu dieser Gruppe gehören das allergische Asthma bronchiale, die allergische Rhinokonjunktivitis (Heuschnupfen und Bindehautentzündung) und das atopische Ekzem oder Neurodermitis (Ring et al. 2000). Eine hohe Prävalenz von 5% bis zu 30% in den Industrienationen (Traidl-Hoffmann et al. 2009) macht aus diesen Krankheiten, die auch zum atopischen Formenkreis zusammengefasst werden, wahre Volkskrankheiten mit großer sozioökonomischer Relevanz. So ist beschrieben, dass Patienten, die an allergischen Erkrankungen leiden, eine geringere Lebensqualität aufweisen, zu Komorbiditäten neigen und steigende Gesundheitskosten verursachen (Pawankar et al. 2011). Dabei können diese drei Krankheitsbilder sowohl nebeneinander auftreten, als auch ineinander übergehen („atopic march“) (Bieber et al. 2008).

Die Pathogenese der atopischen Erkrankungen basiert dabei auf einem komplexen Zusammenspiel aus genetischer Prädisposition, Umweltfaktoren und dem Sozialverhalten. Zu den genetischen Faktoren zählen beim atopischen Ekzem und beim Asthma bronchiale Mutationen in Epithelzellen, die eine gestörte Barrierefunktion und damit einerseits einen erhöhten transepidermalen Wasserverlust und andererseits eine erleichterte Penetration von Allergenen durch Haut und Schleimhaut zur Folge haben. Des Weiteren weisen alle drei atopischen Erkrankungen eine Th2-dominierte Immunitätslage auf.

Dies führt bei Atopikern häufig zu allergischen Reaktionen vom Soforttyp, die durch Th2-Zellen, B-Zellen, spezifisches IgE und Mastzellen ausgelöst werden (Bieber et al. 2008, Fanta et al. 2009).

Eine wichtige Rolle in der Pathogenese atopischer Erkrankungen kommt auch Th1-Zellen zu. So zeichnet sich das atopische Ekzem durch einen biphasischen Entzündungsverlauf aus: Der Initialphase, charakterisiert durch eine Th2-Immunantwort, folgt die chronische Phase, in der Th0-Zellen und Th1-Zellen das Entzündungsgeschehen dominieren (Grewe et al. 1995). Passend hierzu lassen sich in der Akutphase der Läsionen vermehrt Th2-assoziierte Zytokine wie Interleukin-4, Interleukin-5 und Interleukin-13 nachweisen, während in der chronischen Phase Th1-assoziierte Zytokine wie Interferon- $\gamma$ , Interleukin-12, Interleukin-5 und GM-CSF vorherrschen (Bieber et al. 2008).

Vor allem Interferon- $\gamma$  führt hierbei zu vermehrter Apoptose von Keratinozyten, welche neben der gestörten Barrierefunktion der Epidermis und chronisch-rezidivierender Entzündungen charakteristisch für das atopische Ekzem ist (Rebane et al. 2012).

Auch in Biopsien der Bronchialschleimhaut von Asthmatikern beobachteten Apoptose von Epithelzellen scheinen Th1-assoziierte Zytokine wie Interferon- $\gamma$  eine wichtige Rolle zu spielen (Trautmann et al. 2002).

Th17-assoziierte Zytokine wie IL-17 und IL-22 tragen zu chronischen Umbauprozessen im Gewebe von Asthmatikern bei und führen über die Rekrutierung von Neutrophilen zu einer Verschlimmerung der Erkrankung (Nembrini et al. 2009). Passend hierzu scheinen sowohl die Plasmakonzentration von IL-17 und IL-22 als auch die Zahl der Th17-Zellen selbst abhängig von der Schwere der Erkrankung anzusteigen (Zhao et al. 2010). Zusätzlich sind die Effekte von IL-17 und IL-22 durch Steroide kaum beeinflussbar (Chakir et al. 2003, McKinley et al. 2008). Th17-Zellen spielen somit eine wichtige Rolle vor allem in der Pathogenese von schweren therapieresistenten Formen des Asthma bronchiale.

Auch im atopischen Ekzem scheinen Th17-Zellen praktisch ausschließlich proinflammatorische Effekte zu haben: Interleukin-17 wird in akuten Läsionen von Patienten mit atopischem Ekzem exprimiert und die Anzahl der Th17-Zellen im peripheren Blut korreliert mit dem Schweregrad der Erkrankung (Souwer et al. 2010). Interleukin-17 wird speziell durch mikrobielle Bestandteile auf der Haut induziert und steigert die Produktion von Interleukin-8 und des antimikrobiellen Peptides HBD-2. Durch das Th2-dominierte Mikromilieu in der Haut von Atopikern wird dieser Effekt durch die Th2-assoziierten Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 partiell wieder inhibiert, wodurch die Initiierung einer effektiven Immunantwort gegen extrazelluläre Pathogene wie *Staphylococcus aureus* verhindert wird (Eyerich et al. 2009). Zusammen mit anderen Faktoren führt dies zu den für das atopische Ekzem charakteristischen chronisch-rezidivierenden Entzündungen.

Zusammen mit Interferon- $\gamma$  steigert Interleukin-17 außerdem die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Keratinozyten und ermöglicht somit T-Zell-Bindung und T-Zell-medierte Zytotoxizität, die zur Apoptose der Hautzellen führt (Cavani et al. 2012).

Th17-Zellen kommt somit auch im atopischen Ekzem eine wesentliche aggravierende Rolle zu.

## 1.3 Theoretische Grundlagen

### 1.3.1 Dendritische Zellen

Morphologisch sind Dendritische Zellen (DZ) durch lange fingerartige Zytoplasma-Ausläufer charakterisiert, welche namensgebend (dendriticus = verzweigt) für diesen 1973 von Ralph Steinman erstmals in der Milz von Mäusen beschriebenen Zelltyp sind (Rowley et al. 2012, Steinman et al. 1973).

Sie sind die potentesten Antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems und spielen eine zentrale Rolle in der Aktivierung und Regulierung von angeborener und erworbener Immunantwort (Banchereau et al. 1998).

Sie zeichnen sich unter anderem dadurch aus, dass sie Antigene in der Peripherie aufnehmen können, anschließend zu drainierenden Lymphknoten wandern und dort über MHC-T-Zell-Rezeptor Interaktion eine adaptive Immunantwort initiieren. Dabei können Dendritische Zellen auf exogene Stimuli reagieren und durch Hochregulierung von kostimulatorischen Molekülen wie CD40, CD80 und CD86 und Zytokinsekretion (zum Beispiel Interleukin-6, Interleukin-12, Interleukin-23) Einfluss auf die T-Zell-Antwort nehmen (Ruiter et al. 2012). Verschiedene Subtypen von Dendritischen Zellen mit jeweils spezifischen Aufgaben sind bekannt. Allgemein kann man myeloide von plasmazytoiden DZs unterscheiden. Zu den myeloiden DZs gehören die in dieser Studie verwendeten Monozyten-abgeleiteten Dendritischen Zellen (MoDZs), die *in vitro* durch Zugabe von GM-CSF/TNF- $\alpha$  und Interleukin-4 aus Monozyten generiert werden können und im Zuge dieser Entwicklung den Oberflächenmarker CD14 verlieren und CD1a exprimieren (Reid et al. 2000).

Im Knochenmark aus Vorläuferzellen entstanden, migrieren unreife DZs aus der Blutzirkulation in Gewebe, wo sie kontinuierlich über Phagozytose und Makropinozytose Antigene aufnehmen und prozessieren. Unreife DZs zeigen niedrige Expression von MHC I und MHC II-Molekülen sowie von kostimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86 (Mellman et al. 2001). Die Aktivierung der Zellen zu reifen DZs kann durch eine Vielzahl von Signalen induziert werden (siehe Abb. 1.3-1): Dazu gehören bakterielle oder virale Produkte, die direkt an die Familie der Toll-like-Rezeptoren binden. Ein für die vorliegende Arbeit relevantes Beispiel hierfür ist Lipopolysaccharid (LPS), ein Endotoxin gramnegativer Bakterien, welches an den Toll-like-Rezeptor 4 bindet (Akira et al. 2006, Douin-Echinard et al. 2008). Reife Dendritische Zellen exprimieren nun vermehrt kostimulatorische Moleküle und MHC Moleküle sowie unter anderem den CC-Chemokin-Rezeptor 7, der ihnen ermöglicht, in drainierende Lymphknoten zu wandern (Kapsenberg et al. 2003).

Dort präsentieren sie T-Helferzellen auf ihrer Oberfläche über den MHC II-Rezeptor das prozessierte Antigen.

Voraussetzung für die Einleitung einer T-Zell-Antwort ist die Erkennung des präsentierten Antigens durch den spezifischen T-Zell-Rezeptor. Darüber hinaus sind für die Induktion einer adäquaten T-Zell-Antwort jedoch modulierende Einflüsse von kostimulatorischen Molekülen notwendig: So werden die T-Zellen über die Bindung von CD80 und CD86 an CD28 aktiviert. Weiterhin sind T-Zellen in der Lage, über CD40-CD154 die Dendritischen Zellen zu aktivieren. Zusätzlich nehmen durch die Dendritischen Zellen produzierte Zytokine Einfluss auf die Differenzierung von T-Helferzellen in bestimmte Subtypen (Th1, Th2, Th17, Th22, regulatorische T-Zellen siehe 1.3.2) (Traidl-Hoffmann et al. 2009). Exogene Stimuli, die Einfluss auf die Reifung und Zytokinsekretion der Dendritischen Zellen nehmen, beeinflussen somit indirekt die Ausprägung und Richtung der resultierenden Immunantwort.

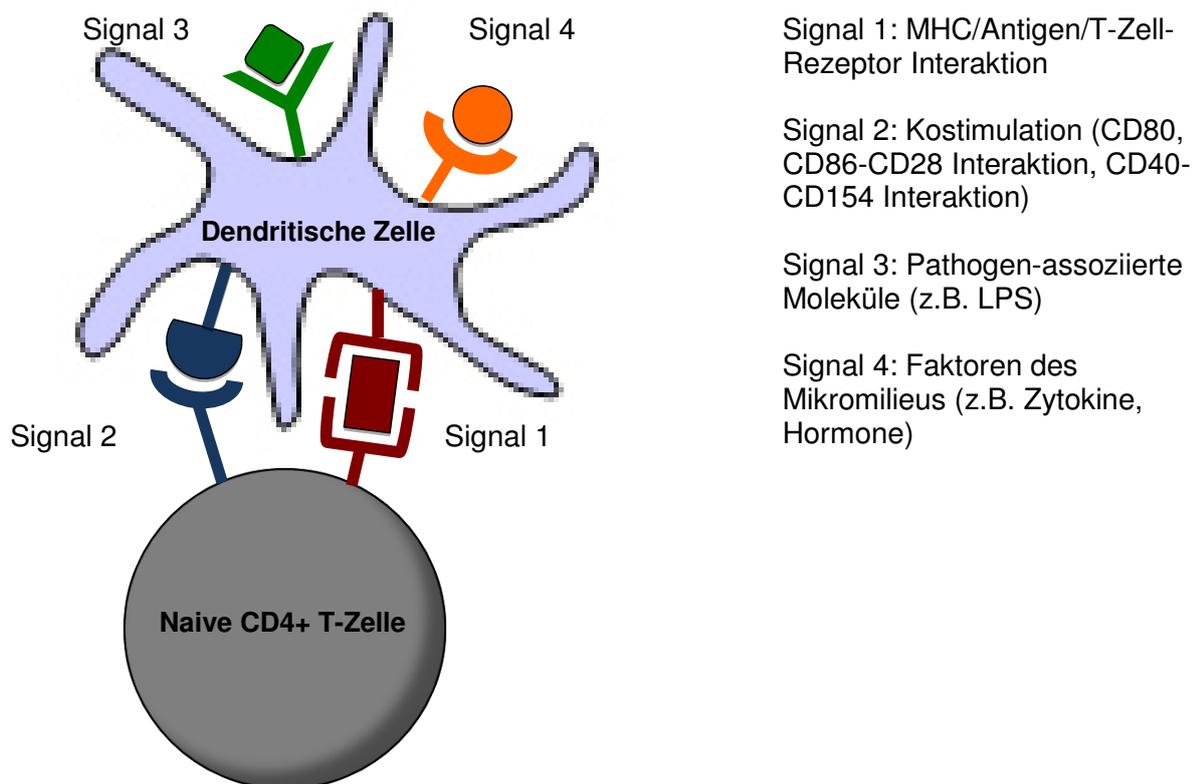


Abb. 1.3-1. Signale zur Aktivierung einer Dendritischen Zelle.

### 1.3.2 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten gehen im Knochenmark aus einer lymphoiden Vorläuferzelle hervor und migrieren in den Thymus, wo sie zu naiven T-Zellen mit antigenspezifischen T-Zell-Rezeptoren reifen. Sie zirkulieren so lange im Blutstrom durch peripheres lymphoides Gewebe, bis sie auf das über MHC-Rezeptoren von Antigenpräsentierenden Zellen exprimierte korrespondierende Antigen stoßen, proliferieren und zu verschiedenen Effektor-T-Lymphozyten differenzieren (Goldrath et al. 1999). Man unterscheidet CD8-positive T-Zellen von CD4-positiven T-Zellen. Dabei fungieren die Oberflächenproteine CD8 und CD4 als Korezeptoren für MHC-Moleküle: CD8-positive T-Zellen erkennen MHC I-Moleküle und CD4-positive T-Zellen MHC II-Moleküle (Wang et al. 2009). CD8-positive T-Zellen proliferieren und reifen nach Antigenkontakt zu zytotoxischen T-Zellen und sind in der Lage, durch Viren oder andere intrazelluläre Pathogene infizierte Wirtszellen zu töten. Naive CD4-positive T-Zellen proliferieren und differenzieren nach Antigenkontakt abhängig von einem bestimmten Zytokinmilieu zu verschiedenen Subpopulationen von T-Helferzellen mit spezifischem Zytokinprofil und Effektorfunktionen (siehe Abbildung 1.3-2).

Das in den achtziger Jahren von Mosmann und Coffman etablierte Th1/Th2-Konzept (Mosmann et al. 1986) wurde in den letzten Jahren um weitere eigenständige T-Helferzellpopulationen erweitert: Die Richtung der Differenzierung ist dabei vom Mikromilieu abhängig, unter anderem von Zytokinen, die von Dendritischen Zellen produziert werden: So steigert Interleukin-4 die Differenzierung und klonale Expansion von Th2-Zellen. Interleukin-12, Interleukin-18 und Interleukin-27 induzieren die Th1-Zell-Differenzierung, Interleukin-4 und TGF- $\beta$  die Th9-Zell-Differenzierung. Interleukin-6, Interleukin-21, Interleukin-23 führen zur Induktion einer Th17-gerichteten Immunantwort und TNF- $\alpha$ , IL-6 unterstützen die Differenzierung von Th22-Zellen (Akdis et al. 2009, Akdis et al. 2011). Die Schlüsselzytokine für die Induktion einer regulatorischen Immunantwort sind Interleukin-10 und TGF-beta (Akdis et al. 2009).

Charakterisiert durch ein bestimmtes Zytokinprofil sind die T-Zell-Subpopulationen nun in der Lage, bestimmte Effektorfunktionen auszuführen: Th1-Zellen produzieren große Mengen an Interferon- $\gamma$ , aktivieren Makrophagen und spielen eine wichtige Rolle in der Beseitigung von intrazellulären Pathogenen.

Th2-Zellen produzieren Interleukin-4, Interleukin-5, Interleukin-13 und Interleukin-25 und tragen durch Induktion der Produktion von IgE-Antikörpern durch B-Zellen und der Förderung einer Eosinophilen Entzündung zur Beseitigung extrazellulärer Parasiten bei (Abbas et al. 1996, Korn et al. 2007).

Th17-Zellen produzieren die Zytokine IL-17A/F, IL-22 und IL-26 und sind an der Immunantwort gegen extrazelluläre Pilze und Bakterien beteiligt. Des Weiteren sind sie mit

entzündlichen Hauterkrankungen, der rheumatoiden Arthritis, der experimentellen Enzephalo-Myelitis und entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert (Bettelli et al. 2008).

Th22-Zellen sind durch die Sekretion der Zytokine IL-22 und TNF- $\alpha$  sowie das Fehlen der IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-17 Produktion charakterisiert. Erste Daten zu diesen kürzlich entdeckten Zellen weisen unter anderem auf eine Rolle in entzündlichen Hauterkrankungen hin (Eyerich et al. 2009).

Th9-Zellen sezernieren IL-9 und scheinen eine proinflammatorische Rolle in verschiedenen Autoimmunerkrankungen zu spielen (Jabeen et al. 2012).

Regulatorische T-Zellen, wie die natürlich vorkommenden CD4+CD25+Treg-Zellen und induzierbare, allergenspezifische IL-10 produzierende Treg Typ1-Zellen (Tr1) oder TGF-beta sezernierende Th3-Zellen, hemmen die Immunantwort und spielen somit zum Beispiel eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Toleranz gegen Allergene (Akdis et al. 2009, Liu et al. 2006).

Jedem T-Zell-Subtyp kommt somit eine bestimmte Aufgabe im komplexen Zusammenspiel der Immunzellen zu, welches letztendlich zur Initiierung einer adäquaten Immunantwort führt.

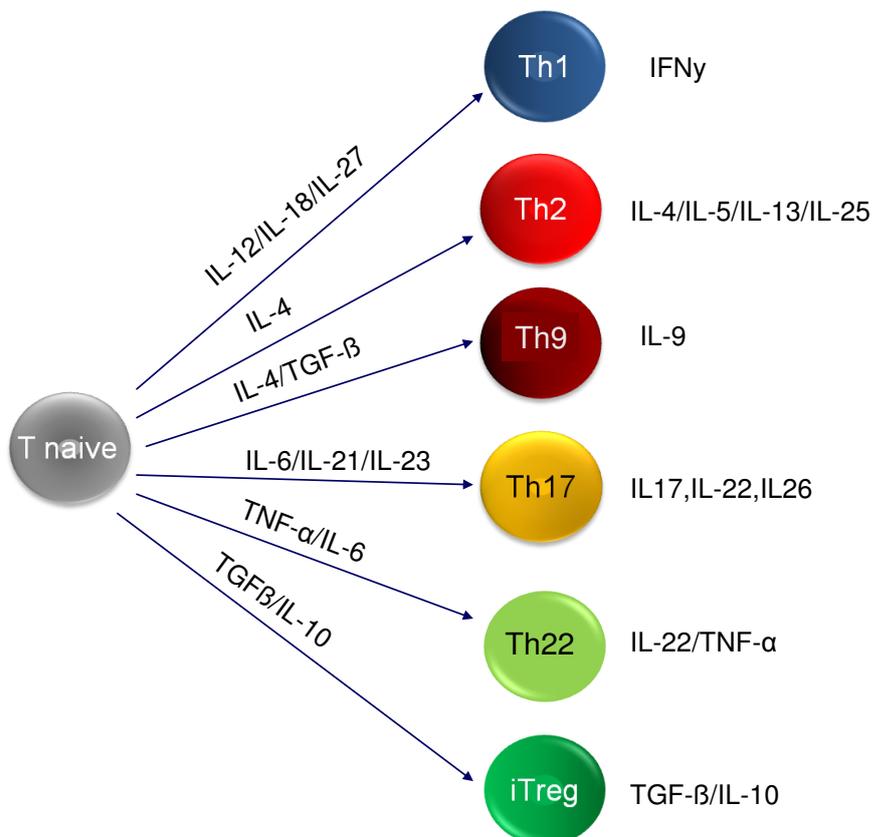


Abb. 1.3-2. T-Zell-Differenzierung abhängig vom Zytokinmilieu und T-Zell-Subpopulationen mit charakteristischen Effektorzytokinen.

### 1.3.3 Sexualhormone

Sexualhormone gehören zur Gruppe der Steroidhormone und regulieren die Fortpflanzung sowie die Ausbildung von männlichen und weiblichen Geschlechtsmerkmalen. Zu den weiblichen Sexualhormonen gehören die Östrogene und Gestagene, die vor allem in Ovar und Plazenta, in geringer Menge in der Nebennierenrinde, im Hoden und von der fetoplazentaren Einheit gebildet werden. Das Testosteron, wichtigstes männliches Sexualhormon, wird in den Leydig-Zwischen-Zellen im Hoden und in geringer Menge auch im Ovar und in der Nebennierenrinde gebildet (Pschyrembel 2007).

Zu den Hauptfunktionen der Östrogene gehören die Regulierung von Wachstum und Reifung der weiblichen Geschlechtsorgane und die Entwicklung der sekundären Geschlechtsmerkmale. Des Weiteren spielen sie eine wichtige Rolle beim Knochenwachstum.

Progesteron ist als Hauptvertreter der Gestagene für die Nidation und die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft notwendig.

Testosteron bewirkt die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale beim Mann und hat virilisierende und anabole Wirkungen (Rassow et al. 2012).

Darüber hinaus scheinen Sexualhormone eine wichtige Rolle in der Regulierung des Immunsystems zu spielen, was unter anderem eine Erklärung für die häufig beobachteten Geschlechtsunterschiede in der Prävalenz und Ausprägung verschiedener Krankheiten sein könnte (siehe Kapitel 1.4).

Sexualhormone werden durch enzymgesteuerte Umwandlung ausgehend von Cholesterolsynthetisiert. Dabei werden Östrogene ausgehend von Androgenen mit Hilfe der Aromatase CYP19A1 gebildet. Progesteron steht relativ am Anfang der Synthesekette der Steroidhormone und wird ausgehend von Pregnenolon gebildet, welches direkt aus Cholesterols hervorgeht (Rassow et al. 2012).

Der Hormonspiegel der weiblichen Sexualhormone ist dabei abhängig vom Menstruationszyklus und bei Frauen wesentlich höher als bei Männern. Gleichfalls sind Androgenspiegel bei der Frau messbar, jedoch bei Männern etwa zehnfach höher. Tabelle 1.3-1 gibt einen Überblick über die Plasmakonzentrationen der wichtigsten Vertreter der Sexualhormone: Testosteron, Progesteron und das wirksamste natürliche Östrogen 17 $\beta$ -Estradiol (E2).

[nM]	♀	♂
Testosteron	1,3-2,6	10-35
17β-Estradiol	0,15-0,73 (follikular) 0,37-0,55 (luteal)	0,04-0,21
Progesteron	3 (follikular) 36 (luteal)	3

*Tabelle 1.3-1. Physiologische Konzentrationen von Sexualhormonen bei Frauen und Männern. Angabe in nanomol pro ml.*

Auf die jeweiligen Zielzellen können Sexualhormone dabei über den klassischen genomischen Weg oder über nicht genomische Wege wirken (siehe Abb. 1.3-3).

Beim genomischen Weg diffundieren die lipophilen Sexualhormone durch die Zellmembran und binden an spezifische zytosolische Hormonrezeptoren (Östrogenrezeptor  $\alpha/\beta$ , Progesteronrezeptor, Androgenrezeptor). Der Hormon-Rezeptor-Komplex transloziert in den Nukleus, dimerisiert und bindet an Hormon responsive Elemente (HRE) in der Promotorregion von verschiedenen Genen, was letztendlich in einer Beeinflussung der Genexpression resultiert.

Nicht genomische Effekte sind nicht durch klassische Hormonrezeptoren vermittelt.

Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie wesentlich schneller eintreten. Des Weiteren sollen sie durch höhere Sexualhormonkonzentrationen ausgelöst werden. Als Mechanismen werden dabei Aktivierung von MAP-Kinasen und endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthasen (eNOS) diskutiert.

Weitere Signalwege, die zur Induktion von schnellen Effekten führen, erfolgen über die Aktivierung von Adaptermolekülen („second messengers“), die zu einer Phosphorylierung von Kinasen und Änderungen im Ionenfluss durch die Zellmembran führen. Auch scheinen teilweise Membran assoziierte Rezeptoren eine Rolle zu spielen (Furukawa et al. 2007).

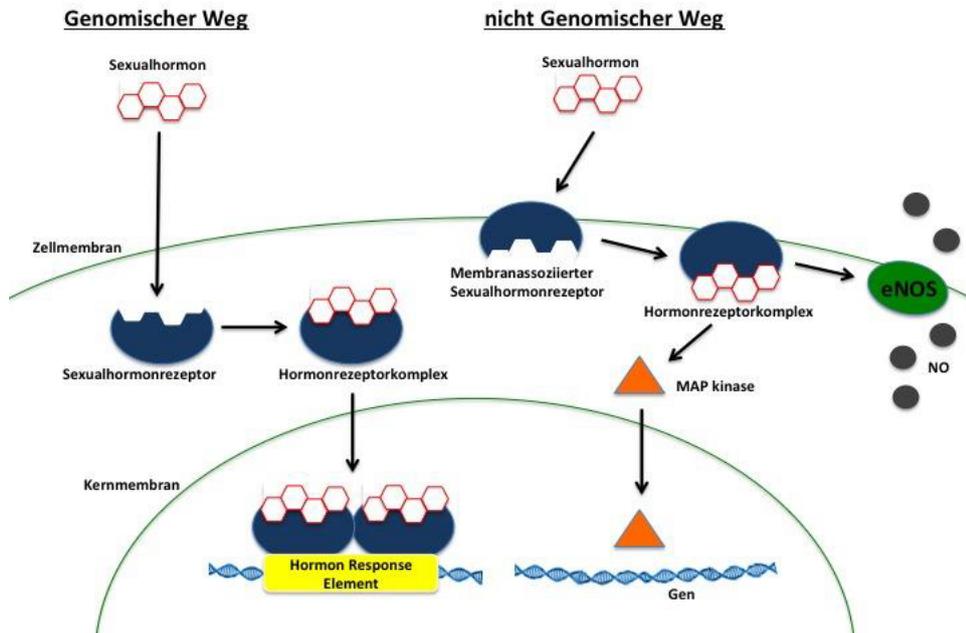


Abb. 1.3-3. Genomische und nicht genomische Signalwege von Sexualhormonen. Eigene Darstellung nach (Furukawa et al. 2007).

Genomischer Weg: Sexualhormone diffundieren in die Zelle, binden an zytosolische Hormonrezeptoren und binden als Hormonrezeptorkomplex an Hormon responsive Elemente.

Nicht genomischer Weg: Sexualhormone binden an membranassoziierte Rezeptoren und aktivieren unter anderem MAP-Kinasen und endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthasen (eNOS).

## 1.4 Sexualhormone und atopische Erkrankungen

Geschlechtsunterschiede in der Immunantwort von Männern und Frauen sind seit langem bekannt: Frauen zeigen signifikant weniger Infektionen als Männer. Diese im Vergleich zu Männern gesteigerte Immunantwort ist vorteilhaft bei Infektionen und Sepsis, jedoch von Nachteil bei Autoimmunerkrankungen, die bei Frauen häufiger vorkommen als bei Männern (Straub et al. 2007). Auch atopische Erkrankungen zeichnen sich durch eine dysregulierte Immunantwort aus, die letztendlich zu chronisch rezidivierenden Entzündungen und Gewebeschädigung führt.

Geschlechtsunterschiede sind in der Prävalenz und Ausprägung von Asthma bronchiale und atopischem Ekzem beschrieben: Jungen unter 16 Jahren leiden häufiger unter Asthma bronchiale als gleichaltrige Mädchen. Nach der Pubertät kehrt sich dieses Verhältnis um und Frauen sind nicht nur häufiger, sondern auch schwerer betroffen (Almqvist et al. 2008, Jensen-Jarolim et al. 2008).

Auch das atopische Ekzem kommt bei Jungen vor der Pubertät häufiger vor und betrifft nach der Pubertät mehr Frauen (Chen et al. 2008, Harrop et al. 2007, Mohrenschlager et al. 2006).

Ein Einfluss von Sexualhormonen auf Prävalenz und Verlauf von atopischen Erkrankungen scheint bei Betrachtung der epidemiologischen Datenlage somit sehr wahrscheinlich zu sein. Dazu passend ist teilweise eine Verschlechterung von Asthma bronchiale bei Frauen in der prämenstruellen Phase beobachtet worden (Murray et al. 1999). Auch bei Patientinnen mit atopischem Ekzem verschlechterte sich in einer Studie zu 47 Prozent das Hautbild vor der Menstruation (Kiriya et al. 2003).

Weiterhin scheint sich vor allem schweres Asthma während der Schwangerschaft teilweise zu verschlechtern (Gluck et al. 2004).

Auch medikamentös herbeigeführte Veränderungen des Hormonhaushalts, wie sie bei Einnahme von Kontrazeptiva oder Hormonersatztherapie vorkommen, scheinen atopische Erkrankungen zu beeinflussen: So zeigte eine Studie eine erhöhte Prävalenz von Asthma bei Frauen, die Kontrazeptiva einnehmen (MacSali et al. 2009). Die Einnahme von Hormonen im Zuge der Hormonersatztherapie führte zu höherer Prävalenz von Asthma bei perimenopausalen Frauen (Gomez Real et al. 2006).

Passend zu der beobachteten Korrelation zwischen dem Verlauf von atopischen Erkrankungen und Veränderungen des Hormonspiegels wie sie im Zyklus der Frau, in der Schwangerschaft oder nach Einnahme von synthetischen Hormonen vorkommen, konnten einige Studien direkte Einflüsse von Sexualhormonen nachweisen:

Im Mausmodell wurde eine Verschlechterung von Asthma bronchiale durch Progesteron beschrieben (Mitchell et al. 2007). Darüber hinaus wirkte das männliche Sexualhormon Dehydroepiandrosteron hemmend auf das Fortschreiten eines durch Hausstaub induzierten Modells von Asthma in der Maus (Yu et al. 2002). Des Weiteren konnten in einer Studie Östrogenrezeptorpolymorphismen mit einem höheren Risiko für die Entwicklung von Asthma bei Frauen korreliert werden (Dijkstra et al. 2006).

Ein direkter Einfluss von Sexualhormonen auf Immunzellen wird durch das Vorhandensein von Hormonrezeptoren auf verschiedenen Effektorzellen erhärtet: Sowohl der Östrogenrezeptor  $\alpha$  als auch der Östrogenrezeptor  $\beta$  wird unter anderem von T-Zellen, B-Zellen, Dendritischen Zellen, Makrophagen, Neutrophilen und natürlichen Killerzellen exprimiert (Fish et al. 2008).

Einige Studien zeigen Effekte von Sexualhormonen auf die Effektorphase von Allergien: So konnte gezeigt werden, dass Östrogene und Xenoöstrogene Mastzellen aktivieren und zur Mediatorausschüttung stimulieren (Zaitsev et al. 2007, Narita et al. 2007).

Im Zusammenhang mit T-Zellen sind Sexualhormone bislang nur selten beschrieben. In einer Studie induzierte  $17\beta$ -Estradiol dosisabhängig die Produktion des Th17-assoziierten Zytokins IL-6 und von proinflammatorischen Chemokinen in humanen Monozyten-abgeleiteten Dendritischen Zellen *in vitro* (Bengtsson et al. 2004).

Im Maussystem (Stimulation Dendritischer Zellen von weiblichen C57BL/6 Mäusen) konnte eine Induktion des Th1-assoziierten Zytokins Interleukin-12 durch  $17\beta$ -Estradiol beobachtet werden (Siracusa et al. 2008, Wilcoxen et al. 2000).

Eine wichtige Rolle scheint  $17\beta$ -Estradiol auch in der Differenzierung von Dendritischen Zellen zu spielen: Humane Monozyten-abgeleitete Dendritische Zellen zeigten nach Zugabe der Antiöstrogene Toremifen und Tamoxifen Defizite in der Fähigkeit, die Proliferation von allogenen T-Zellen zu induzieren sowie Interleukin-12 zu produzieren (Komi et al. 2000).

Während  $17\beta$ -Estradiol somit eher proinflammatorisch zu wirken scheint, zeigen einige Studien Hinweise auf immunsuppressive Effekte von Androgenen: So wurde die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in Monozyten/Makrophagen durch Dehydroepiandrosteron inhibiert (Burger et al. 2002). Passend hierzu konnte gezeigt werden, dass Dehydroepiandrosteron die Proliferation von murinen T-Zellen hemmt (Solano et al. 2008).

## 2. Ziel der Arbeit

Epidemiologische Studien zeigen einen eindeutigen Zusammenhang zwischen Hormonstatus und Ausprägung allergischer Erkrankungen. So leiden vor der Pubertät mehr Jungen unter Asthma bronchiale und atopischem Ekzem, während unter Erwachsenen beim weiblichen Geschlecht sowohl eine höhere Inzidenz als auch ein höherer Schweregrad zu beobachten ist.

Eine direkte Beeinflussung von Immunzellen durch Sexualhormone wird durch mehrere Studien bekräftigt.

Diese Arbeit soll den Einfluss der wichtigsten Sexualhormone 17 $\beta$ -Estradiol, Progesteron und Testosteron auf die zelluläre Interaktion zwischen Dendritischen Zellen und T-Zellen untersuchen.

Besonderes Interesse liegt dabei auf einer möglichen Beeinflussung der Th17-Immunantwort, die mit schwerem atopischem Ekzem und therapieresistentem Asthma bronchiale assoziiert wird, beides Erkrankungen, die bei Frauen häufiger vorkommen als bei Männern. Die Hypothese ist hierbei, dass weibliche Sexualhormone eine Th17-Immunantwort induzieren.

Im Detail sollen folgende Fragen geklärt werden:

### 1. Haben Sexualhormone direkte Effekte auf Dendritische Zellen?

Zur Klärung dieser Frage wird ein hormonreduziertes Kultursystem etabliert und anschließend der Einfluss von verschiedenen Sexualhormonkonzentrationen auf Monozyten-abgeleitete Dendritische Zellen von weiblichen Spendern untersucht. Im Fokus stehen hierbei die Analyse von Hormonrezeptoren, die Beeinflussung von Reifungs- und Koaktivierungsmarkern (CD80, CD83, CD86, CD40, HLA DR, HLA ABC, CD1a) sowie Effekte auf die LPS induzierte Sekretion T-Zell-differenzierender Zytokine (IL-6, IL-12, IL-23).

### 2. Sind direkte Effekte von Sexualhormonen auf Dendritische Zellen relevant für die Induktion einer bestimmten T-Zell-Antwort in T-Gedächtniszellen und naiven T-Zellen?

Hierzu werden die Sexualhormon-konditionierten Dendritischen Zellen in Kokultur mit allogenen, von weiblichen Spendern isolierten naiven T-Zellen und T-Gedächtniszellen gebracht. Die Analyse der Proliferationsaktivität und des Zytokinmusters soll mögliche indirekte Effekte durch Sexualhormone auf T-Zellen beleuchten.

Zusammenfassend soll diese Studie einen Beitrag zum Verständnis der Korrelation zwischen Sexualhormonen und immunologischen Mechanismen leisten, die aufgrund der geschlechtsspezifischen Ausprägung atopischer Erkrankungen vermutet wird. Dies könnte den Weg zu neuen individuellen Therapiekonzepten ebnen.

### **3. Materialien und Methoden**

#### **3.1 Materialien**

##### 3.1.1 Probanden

Die Blutentnahmen erfolgten bei freiwilligen weiblichen Probanden im Alter zwischen 18 und 40 Jahren. Einschlusskriterium war hierbei ein Gesamt-IgE-Spiegel von unter 50kU/ml, Rast-Klasse 0 im Test auf spezifisches IgE gegen neun verschiedene Allergene: Dermatophagoides pteronyssinus (Hausstaubmilbe), Katzenschuppen, Weizenmehl, Sellerie, Lieschgras, Roggen, Birke, Hasel, Beifuß sowie eine von atopischen Erkrankungen freie Anamnese.

##### 3.1.2 Biologisches Material

β-Estradiol > 98%	Sigma-Aldrich, München Best. Nr. E8875
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München Best. Nr. A2153
Charcoal/Dextran Treated FBS	Hyclone Laboratories Inc, Utah U.S.A Best. Nr. SH30068
FBS	Perbio, Bonn Best. Nr. CH30160.03
Human male AB Serum	Sigma-Aldrich, München Best. Nr. H4522
Humanes Serum Albumin (HSA) 96-99%	Sigma-Aldrich, München Best. Nr. A1653
Progesterone > 99%	Sigma-Aldrich, München Best. Nr. P0130
Testosterone > 98%	Sigma-Aldrich, München Best. Nr. T1500
Ultrapure lipopolysaccharide from E. coli K12 (LPS)	Invivogen San Diego USA Best. Nr. tlrl-pektps

### 3.1.3 Antikörper, Zytokine, Kits

#### Antikörper

Androgen Receptor Ab-1; Clone AR 441; Mouse Monoclonal Antibody	Dianova, Hamburg Best. Nr. DLN-09476
APC-Mouse IgG1 k Isotype control	Becton Dickinson, Heidelberg Best. Nr. 555751
APC Monoclonal Anti-human IL-22	R&D, Wiesbaden Best. Nr. IC7821A
APC Rat Anti-human IL10	Becton Dickinson, Heidelberg Best. Nr. 554707
APC Mouse anti-human CD86	Becton Dickinson, Heidelberg Best. Nr. 555660
APC anti-human HLA-DR	eBioscience, San Diego U.S.A Best. Nr. 17-9956-73
APC mouse anti human CD1a	Becton Dickinson, Heidelberg Best. Nr. 559775
Biotin conjugated anti-human IL-6	eBioscience, San Diego U.S.A Best. Nr. 13-7068-85
Biotin conjugated anti-human IL-12p40/70	eBioscience, San Diego U.S.A Best. Nr. 13-7129-85
CD14 Micro Beads, human	MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach Best. Nr. 130-050-201
CD4 Micro Beads, human	MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach Best. Nr. 130-045-101
FITC Mouse IgG1k Isotype control	Becton Dickinson, Heidelberg Best. Nr. 555748
FITC anti human HLA-ABC	eBioscience, San Diego U.S.A Best. Nr. 11-9983-42
FITC anti human CD80	eBioscience, San Diego U.S.A Best. Nr. 11-0809-71
FITC anti human CD40	Becton Dickinson, Heidelberg Best. Nr. 555588
FITC mouse anti human IFN- $\gamma$	Becton Dickinson, Heidelberg Best. Nr. 554700

Human IL-12 p70 matched pair capture, purified, 0,5mg	Becton Dickinson, Heidelberg Best. Nr.555065
PE Mouse IgG1k Isotype control	Becton Dickinson, Heidelberg Best. Nr. 555749
PE anti-human CCR7	Becton Dickinson, Heidelberg Best. Nr. 552176
PE anti-hIL-4	R&D, Wiesbaden Best. Nr. IC204P
PE anti human CD1a	Becton Dickinson, Heidelberg Best. Nr. 555807
PE anti human CD83	eBioscience, San Diego U.S.A Best. Nr. 12-0839-73
PE anti human CD14	Becton Dickinson, Heidelberg Best. Nr. 555398
PE anti human IL-17A eBioscience	San Diego U.S.A Best. Nr. 12-7179
Purified NA/LE mouse anti human CD3	Becton Dickinson, Heidelberg Best. Nr. 555329
Purified NA/LE mouse anti human CD28	Becton Dickinson, Heidelberg Best. Nr. 555725
Purified anti-human IL-6 eBioscience	San Diego U.S.A Best. Nr. 14-7069-85
Östrogen-Rezeptor-Antikörper Mouse	Affinity BioReagents, Hamburg Best. Nr. MA3-310
 Zytokine	
rh IL-2	Proleukin Novartis
rh IL-4	Promocell, Heidelberg Best. Nr. C-61420
rh GM-CSF	Promocell, Heidelberg Best. Nr. C-60422

## ELISA Kits

IL-23 Ready-Set-Go! Human Interleukin-23	eBioscience, San Diego U.S.A Best. Nr. 88-7237-88
IL-17A Ready-Set-Go! Human Interleukin-17A	eBioscience, San Diego U.S.A Best. Nr. 88-7176-88
IL-4 Opt EIA Set Human IL-4	Becton Dickinson, Heidelberg Best. Nr. 555194
IL-10 BD Opt EIA Set Human IL-10	Becton Dickinson, Heidelberg Best. Nr. 555157
IL-22 human IL-22	R&D, Wiesbaden Best. Nr. DY782
Cytofix/Cytoperm Plus Fixation/Permeabilization kit with Golgi Plug	Becton Dickinson, Heidelberg Best. Nr. 555028
IFN $\gamma$ ELISA Ready-Set-Go!	eBioscience, San Diego U.S.A Best. Nr. 88-7316
Naive CD4 $^{+}$ T-cell isolation kit, human	MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach Best. Nr. 130-094-131

### 3.1.4 Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Geräte

#### Chemikalien

2-Mercapto-Ethanol	Sigma Aldrich, München Best. Nr. M-7522
3-H thymidine	Amersham, Freiburg
ABTS	Roche Diagnostics, Mannheim Best. Nr. 10102946001
Aqua ad injectabilia	Delta-Select, Pfullingen
autoMACS Rinsing Solution	MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach Best. Nr. 130-091-222
autoMACS Running Buffer	MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach Best. Nr. 130-091-221
autoMACS Pro Washing Solution	MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach Best. Nr. 130-092-987
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt Best. Nr. 1.00244.0500

DPBS w/o Ca/Mg	Invitrogen, Paisley, Scotland Best. Nr. 14190094
EDTA 0,5M	Invitrogen, Paisley, Scotland Best. Nr. 15575-020
Ethanol absolute for analysis	Merck, Darmstadt Best. Nr. 603-002-00-5
FACS-Flow	Becton Dickinson, Heidelberg Best. Nr. 342003
Heparin 250.000U	Ratiopharm, Ulm Best. Nr. PZN-7833909
Insulin, Human Recombinant, Zinc Solution 5ml	Invitrogen, Paisley, Scotland Best. Nr.12585-014
Ionomycin	Sigma Aldrich, München Best. Nr. I-0634
Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM) (1X), liquid Phenol Red-Free L-Glutamin Invitrogen	Invitrogen, Paisley, Scotland Best. Nr. 21056-023 Paisley, Scotland Best. Nr. 25030024
Lymphoprep	Axis Shield, Heidelberg Best. Nr. 1114545
Na-Pyruvat	Invitrogen, Paisley, Scotland Best. Nr. 11360039
Nonessential aminoacids	Invitrogen, Paisley, Scotland Best. Nr. 11140035
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Paisley, Scotland Best. Nr. 15140130
PMA	Sigma Aldrich, München Best. Nr. P-8139
Propidiumiodid RPMI 1640+L-Glutamine	Sigma Aldrich, München Invitrogen, Paisley, Scotland Best. Nr. 31870-025
Streptavidin-horseradish peroxidase	Amersham Pharmacia Biotech, Nürnbrecht Best. Nr. RPN4401V
Transferrin human	Invitrogen, Paisley, Scotland Best. Nr. 0030124SA

Trypan Blue 0,4% solution	Invitrogen, Paisley, Scotland Best. Nr. T-8154
Tween 20 detergent	Calbiochem, San Diego, U.S.A Best. Nr. 655204
Verbrauchsmaterial	
96 Well Mikrotiterplatten T-form steril	Becton Dickinson, Heidelberg Best. Nr. 351172
96 Well Mikrotiterplatten U-form steril	Sarstedt, Nürnberg Best. Nr. 83.1837.500
96 Well Mikrotiterplatten für ELISA (flachbödig)	Nunc, Roskilde, Dänemark Best. Nr. 449824
50 ml Röhre	Sarstedt, Nürnberg Best. Nr. 62547254
15 ml Röhre	Sarstedt, Nürnberg Best. Nr. 62554502
1,5 ml Eppendorf Röhrchen	Eppendorf, Hamburg Best. Nr. 0030015002
autoMACS separation columns	MiltenyiBiotech, Bergisch Gladbach Best. Nr. 130-021-101
FACS Röhrchen	Thermo Fisher Scientific, Schwerte Best. Nr. AB-0672
Heat sealing paper	Perkin Elmer, Rodgau Best. Nr. 1450-467
Kapillarspalt Objektträger 100µm	Dako, Hamburg Best. Nr. S2025
Melti Lex TMA	Perkin Elmer, Rodgau Best. Nr. 1450-441
Printed Filtermat A	Perkin Elmer, Rodgau Best. Nr. 1450-421
Spritzenvorsatzfilter Millex-GP 0,22 µm Millipore	Millex-GP, Bedford Best. Nr. SLGP033RS
Zellkulturplatten (6 well, 12 well, 24 well)	Becton Dickinson, Heidelberg Best. Nr. 353046 (6 well) Best. Nr. 353043 (12 well) Best. Nr. 353047 (24 well)

## Geräte

AutoMACSpro	MiltenyiBiotech, Bergisch Gladbach
β-Counter	Perkin Elmer, Rodgau
ELISA Reader MRX TC Revelation	Thermo Labsystems
FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Feinwaage	MC1Research,Sartorius, Göttingen
Lichtmikroskop	Axiovert 25, Zeiss, Jena
Microbeta Filtermate Harvester	Perkin Elmer, Rodgau
Microsealer	Perkin Elmer, Rodgau
Multi-channel Pipette	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Zentrifuge	Megafuge 1. OR Heraeus, Hanau
Zentrifuge	Multifuge 1 L-R Heraeus, Hanau

### 3.1.5 Verwendete Medien

#### Serumfreies Medium:

IMDM ohne Phenolrot mit 1% humanem Serum Albumin, Transferrin 4µg/ml, Insulin 4µg/ml, nonessential aminoacids 100x 1:100 verdünnt, L-Glutamin 200mM 1:100 verdünnt, Natrium-Pyruvat 100x 1:100 verdünnt, 2-Mercapto-Ethanol 50mM 1:1000 verdünnt, Penicillin-Streptomycin 20x 1:100 verdünnt.

Steril filtriert, Herstellung nach Bedarf, Lagerung bei 4°C, Verbrauch innerhalb von 7 Tagen.

#### Hormonreduziertes Medium:

IMDM ohne Phenolrot mit 10% Charcoal/Dextran Treated FBS (Hyclone), nonessential aminoacids 100x 1:100 verdünnt, L-Glutamin 200mM 1:100 verdünnt, Natrium-Pyruvat 100x 1:100 verdünnt, 2-Mercapto-Ethanol 50mM 1:1000 verdünnt, Penicillin-Streptomycin 20x 1:100 verdünnt.

Steril filtriert, Herstellung nach Bedarf, Lagerung bei 4°C, Verbrauch innerhalb von 7 Tagen.

#### Humanes DZ Medium:

450ml RPMI 1640 mit 50ml FBS (Perbio), 5ml L-Glutamin, 1ml Gentamycin, 0,5ml 2-Mercapto-Ethanol 50mM.

Steril filtriert, Lagerung bei 4°C, Verbrauch innerhalb von 7 Tagen.

#### Proliferationsmedium:

450ml RPMI 1640 mit 25ml Human male AB Serum (Sigma-Aldrich), 5ml L-Glutamin, 5,6ml nonessential aminoacids, 5,6ml Natrium-Pyruvat, 0,5ml 2-Mercapto-Ethanol 50mM.

Steril filtriert, Lagerung bei 4°C, Verbrauch innerhalb von 7 Tagen.

#### FACS-Puffer:

500ml DPBS w/o Ca/Mg, 0,02% Natrium-Azid, 5% FCS.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Herstellung der Hormonstocklösungen ( $10^{-2}$ M) in Ethanol absolute

17 $\beta$ -Estradiol:

Molare Masse: 272,4g/mol

Für eine Stocklösung von  $10^{-2}$ M wurden mit der Feinwaage 27,24mg  $\beta$ -Estradiol abgewogen, in 10ml Ethanol absolute angelöst (entspricht einer  $10^{-2}$ M Lösung) und nach vollständiger Lösung sterilfiltriert. Lagerung bei 4°C, Verbrauch innerhalb von 30 Tagen.

Progesteron:

Molare Masse: 314,5g/mol

Für eine Stocklösung von  $10^{-2}$ M wurden mit der Feinwaage 31,45mg  $\beta$ -Estradiol abgewogen, in 10ml Ethanol absolute angelöst (entspricht einer  $10^{-2}$ M Lösung) und nach vollständiger Lösung sterilfiltriert. Lagerung bei 4°C, Verbrauch innerhalb von 30 Tagen.

Testosteron:

Molare Masse: 288,4g/mol

Für eine Stocklösung von  $10^{-2}$ M wurden mit der Feinwaage 31,45mg  $\beta$ -Estradiol abgewogen, in 10ml Ethanol absolute angelöst (entspricht einer  $10^{-2}$ M Lösung) und nach vollständiger Lösung sterilfiltriert. Lagerung bei 4°C, Verbrauch innerhalb von 30 Tagen.

### 3.2.2 Zellkultur

#### 3.2.2.1 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMC)

Nicht atopischen Spenderinnen (Einschlusskriterium siehe 3.1.1) wurden 150ml Vollblut aus einer Armvene in heparinisierte 50ml Spritzen entnommen.

Das Blut wurde 1:2 in DPBS w/o Ca/Mg verdünnt und anschließend zu jeweils 25ml vorsichtig auf 15ml Lymphoprep Trennmedium in einer 50ml Zentrifugenröhre geschichtet.

Nach 15min Zentrifugation bei 1000g ohne Bremse waren verschiedene aufgetrennte Schichten erkennbar: Mit der geringsten Dichte oben das verdünnte Zellplasma, anschließend die Bande mit den PBMCs bestehend aus T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und Monozyten. Direkt oberhalb des Trennmediums fand sich eine dünne Schicht aus Thrombozyten und unten im Konus die restliche Zellmasse bestehend aus Erythrozyten und Granulozyten.

Die PBMCs wurden nun vorsichtig mit Hilfe einer 10ml Pipette aspiriert und dreimal mit DPBS w/o Ca/Mg + 5mM EDTA gewaschen (zunächst 10min 589g, dann 10min 301g).

Zur Quantifizierung der PBMCs wurden anschließend 10µl Zellsuspension in 90µl 0,4% Trypan Blau aufgenommen und die vitalen Zellen in einer Neubauer Zählkammer gezählt.

### 3.2.2.2 Isolierung von Monozyten

Monozyten wurden aus PBMCs mit Hilfe des AutoMACSpro (Magnetically Activated Cell Sorting) über Magnetsäulenaufreinigung isoliert: 130µl MACS-Puffer und 30µl CD14 Micro Beads pro  $10^8$  PBMCs wurden 15min bei 4°C inkubiert.

Dabei binden die superparamagnetischen Micro Beads an den jeweiligen Zellmarker (hier CD14), ohne die Funktion oder die Aktivität der Zelle zu beeinträchtigen.

Es folgte ein Waschschrift mit vorgekühltem DPBS w/o Ca/Mg + 2mM EDTA (10min 301g bei 4°C). Nach Resuspension in 500µl MACS-Puffer pro  $10^8$  PBMCs wurden die CD14-positiven Monozyten mit Hilfe des AutoMACSpro und dem Programm POSSEL isoliert. Hierbei werden die Zellen in die MACS-Säule geladen, welche sich in einem Magnetfeld befindet. Während markierte Zellen auf der Säule zurückgehalten werden, verbleiben unmarkierte Zellen im Durchfluss.

### 3.2.2.3 Generierung Dendritischer Zellen

Dendritische Zellen wurden durch Differenzierung aus zuvor isolierten Monozyten (siehe 3.2.2.2) generiert. Hierbei wurden die Monozyten in einer Dichte von  $10^6$  Zellen pro ml in serumfreiem, hormonreduziertem oder humanem DZ Medium (siehe 3.1.5) mit 50U/ml IL-4 und 50U/ml GM-CSF resuspendiert und anschließend a 4ml pro well in einer 6 well Platte ausgesät.

Nach 3 Tagen Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> fand ein Mediumwechsel mit erneuter Zytokinsubstitution statt. Nach 5 bis 6 Tagen wurden die reifen DZs gezählt und für die weiteren Experimente verwendet.

### 3.2.2.4 Stimulation Dendritischer Zellen mit Sexualhormonen

Die reifen DZs wurden nach 5 bis 6 Tagen gezählt und auf  $10^6$ /ml in serumfreiem, hormonreduziertem oder humanem DZ Medium (siehe 3.1.5) eingestellt.

Anschließend erfolgte die Aussaat in eine sterile 12 well Platte, wobei auf 1,5ml Zellsuspension pro well 0,5ml Stimulus gegeben wurden.

Hierzu wurden Konzentrationsreihen aus den Stocklösungen der Hormone 17 $\beta$ -Estradiol, Testosteron und Progesteron (siehe 3.2.1) in den entsprechenden Medien hergestellt. Zusätzlich wurden Ansätze mit und ohne Zugabe von 100ng LPS sowie Medium- und Lösungsmittelkontrollen mitgeführt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 24h. Zur Messung der Zytokinproduktion der Dendritischen Zellen wurde nach der Stimulation der Zellüberstand vorsichtig asserviert und in Aliquots bei -80°C bis zur Analyse mittels ELISA (siehe 3.2.4) aufbewahrt. Außerdem erfolgte eine Analyse der Reifungsmarker mittels Durchflusszytometrie (siehe 3.2.3.3).

### 3.2.2.5 Allogener Lymphozytenstimulationstest

Der allogene Lymphozytenstimulationstest, ursprünglich in der Transplantationsimmunologie angewendet, um Gewebsunverträglichkeiten von Spender und Empfänger festzustellen, dient als *in vitro* Modell für die T-Zell-Aktivierung.

Prinzipiell werden Leukozyten zweier verschiedener Spender für mehrere Tage kokultiviert, wobei T-Zellen durch allogene MHC II-Antigene aktiviert werden und in der Folge proliferieren sowie Zytokine bilden.

In dieser Studie wurde der allogene Lymphozytenstimulationstest verwendet, um die Wirkung von mit Sexualhormonen vorbehandelten Dendritischen Zellen (siehe 3.2.2.4) auf die Polarisierung und Differenzierung allogener T-Zellen zu untersuchen.

Indirekte Effekte von Sexualhormonen auf T-Gedächtniszellen:

Um indirekte Effekte auf T-Gedächtniszellen zu untersuchen, wurden in einem ersten Ansatz von nicht atopischen Spenderinnen (Einschlusskriterium siehe 3.1.1) PBMCs isoliert (siehe 3.2.2.1).

Anschließend wurden die Zellen gezählt und mit CD14-MicroBeads markiert, wobei 130 $\mu$ l MACS-Puffer und 30 $\mu$ l CD14-MicroBeads pro 10<sup>8</sup> PBMCs 15min bei 4°C inkubiert wurden.

Nach einem Waschschrift mit vorgekühltem DPBS w/o Ca/Mg + 2mM EDTA (10min 301g bei 4°C) wurden die Zellen in 500 $\mu$ l MACS-Puffer pro 10<sup>8</sup> PBMCs resuspendiert und anschließend die CD14-positiven Zellen mit Hilfe des AutoMACSpro und dem Programm Depletes aussortiert.

Die CD14-negativen Zellen wurden nun in 160 $\mu$ l MACS-Puffer und 40 $\mu$ l CD4-MicroBeads pro 10<sup>8</sup> PBMCs resuspendiert und für 15min bei 4°C inkubiert.

Nach nochmaligem Waschen mit vorgekühltem DPBS w/o Ca/Mg + 2mM EDTA (10min 301g bei 4°C) wurden die Zellen in 500 $\mu$ l MACS-Puffer pro 10<sup>8</sup> PBMCs aufgenommen und die CD4-positiven T-Gedächtniszellen mittels des Programms Possel des AutoMACSpro isoliert,

gezählt und schließlich in serumfreiem Medium, hormonreduziertem Medium oder Proliferationsmedium (siehe 3.1.5) auf eine Dichte von  $10^6$  Zellen pro ml eingestellt.

Parallel wurden die mit Sexualhormonen vorbehandelten Dendritischen Zellen (siehe 3.2.2.4) zwei bis dreimal mit DPBS w/o Ca/Mg gewaschen und in den entsprechenden Medien in einer Dichte von  $10^5$  Zellen pro ml aufgenommen.

Anschließend wurden in einer 96 well Flachbodenplatte jeweils 100µl DZ- und 100µl T-Zell-Suspension pro well pipettiert, was einer Zellzahl von 100.000 T-Zellen und 10.000 Dendritischen Zellen pro well entsprach. Es wurden zwei Platten zu jeweils Triplikaten angesetzt.

Nach einer Inkubationszeit von 4 Tagen wurde vorsichtig 100µl Zellüberstand abgenommen und bis zur Analyse mittels ELISA bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Die Zellen der ersten Platte wurden zur Messung der Proliferationsaktivität mit 3H-Thymidin markiert (siehe 3.2.5).

Im zweiten Ansatz erfolgte nach Zugabe von 100µl frischen Mediums mit 20 Units IL-2 und einer Verlängerung der Inkubationszeit bis Tag 7 eine intrazytoplasmatische Zytokinfärbung der Zellen (siehe 3.2.3.4).

Indirekte Effekte von Sexualhormonen auf die Differenzierung von naiven T-Zellen:

In einem zweiten Schritt wurde der allogene Lymphozytenstimulationstest verwendet, um indirekte Effekte von Sexualhormonen auf die Differenzierung von allogenen naiven T-Zellen zu untersuchen.

Hierzu wurden von nicht atopischen Spenderinnen (Einschlusskriterium siehe 3.1.1) zunächst PBMCs isoliert (siehe 3.2.2.1) und anschließend mit Hilfe des Naive CD4+ T-cell isolation kit von Miltenyi Biotech naive T-Zellen gewonnen.

Die Isolation erfolgte nach Protokoll des Herstellers: Prinzipiell wurden hierbei PBMCs zunächst mit einem Cocktail von biotinilierten CD45RO, CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD25, CD34, CD36, CD56, CD123, anti-TCR $\gamma/\delta$ , anti-HLA-DR und CD235a (glycophorin A) Antikörpern inkubiert und anschließend mit Anti-Biotin MicroBeads magnetisch markiert.

Die nicht markierten naiven T-Zellen konnten nun mit Hilfe des AutoMACSpro und dem Programm Depletes von den nicht T-Zellen und T-Gedächtniszellen getrennt werden.

Die so gewonnenen naiven T-Zellen wurden in hormonreduziertem Medium auf  $2 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt.

Parallel wurden die mit Sexualhormonen vorbehandelten Dendritischen Zellen gewaschen (siehe oben) und in einer Dichte von  $10^5$  Zellen pro ml in hormonreduziertem Medium aufgenommen.

Der allogene Lymphozytenstimulationstest wurde schließlich in einer 96 well Flachbodenplatte mit 200.000 naiven T-Zellen und 10.000 Dendritischen Zellen pro well angesetzt.

Nach einer Inkubationsdauer von 5 Tagen wurden 100µl Zellüberstand asserviert und bis zur Analyse mittels ELISA bei -80°C aufbewahrt.

Ein Teil der Zellen wurde wiederum zur Messung der Proliferationsaktivität mit 3H-Thymidin markiert (siehe 3.2.5), während der andere Teil nach Zugabe von 100µl frischen Mediums mit 20 Units IL-2 und einer Verlängerung der Inkubationszeit bis Tag 7 intrazytoplasmatisch auf Zytokine gefärbt wurde (siehe 3.2.3.4).

Abbildung 3.2-1 zeigt einen Überblick über den Versuchsaufbau.

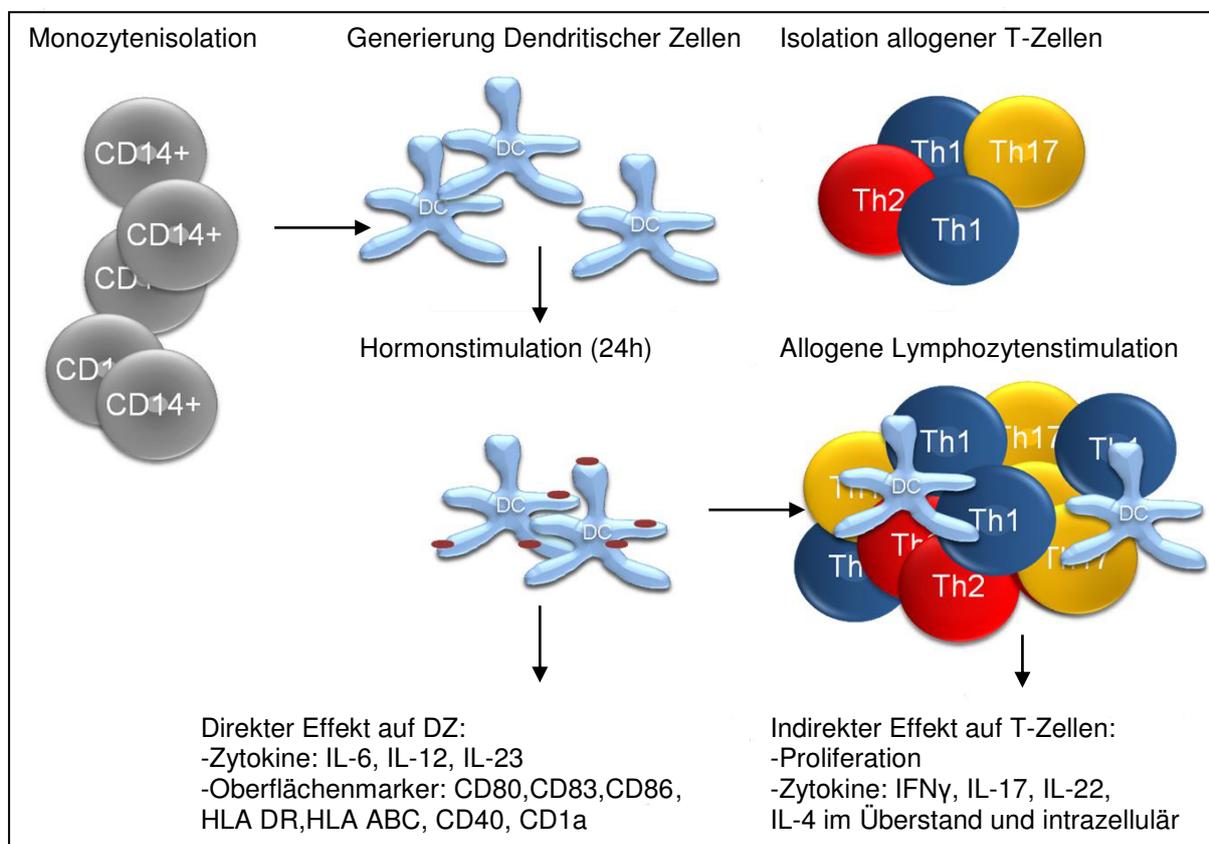


Abb. 3.2-1. Versuchsaufbau.

### 3.2.3 Durchflusszytometrie

#### 3.2.3.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein optisches Messsystem, das eine phänotypische und funktionelle Charakterisierung von Zellpopulationen ermöglicht.

Sie basiert auf der Anfärbung zellassoziierter Moleküle mit Antikörpern, die an Fluorochrome gekoppelt sind.

Nach Anregung mit monochromatischem Licht - beim hier verwendeten FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg) Argon-Laserlicht der Wellenlänge 488nm - emittieren diese Fluoreszenzlicht, welches in verschiedenen Kanälen detektiert werden kann.

Prinzipiell wird für die Analyse ein ständiger Fluss einer Trägerflüssigkeit erzeugt, in welcher die Zellen aufgenommen und mit Hilfe eines Mantelstroms nach dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung in Einzelzellsuspensionen hintereinander durch das Laserlicht geführt werden. Dies ermöglicht eine simultane Analyse der Größe, der Granularität und der Fluoreszenz jeder einzelnen Zelle. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird dabei in den entsprechenden Kanälen registriert.

Durch Detektion des Streulichtes lassen sich Aussagen über die Größe und Granularität der einzelnen Zellen machen: Das nach Durchtritt der Zellen durch das Laserlicht in Vorwärtsrichtung gestreute Licht wird vom FSC-Detektor (Forward Scatter) gemessen und korreliert mit der Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht wird vom SSC-Detektor registriert und lässt Rückschlüsse auf Zelldichte und Granularität zu.

Graphisch in Dot Plots veranschaulicht, ergeben sich anhand dieser morphologischen Kriterien für bestimmte Zellpopulationen bestimmte Bereiche: Je größer eine Zelle ist, umso stärker wird das Licht im flachen Winkel gebeugt und desto weiter rechts erscheint sie auf der FSC-Achse. Je stärker granuliert sie ist, desto mehr bricht sie das Licht im rechten Winkel und desto weiter oben erscheint sie auf der SSC-Achse (Jacoby et al. 2010).

Neben der Phänotypisierung von Zellen bieten sich weitere Möglichkeiten wie die Unterscheidung zwischen vitalen und nekrotischen Zellen, die intrazelluläre Analyse der Zytokinproduktion, die Färbung von Rezeptoren und die Untersuchung von Oberflächenmarkern.

### 3.2.3.2 Intrazelluläre Färbung der Hormonrezeptoren auf Dendritischen Zellen

Die Analyse der Hormonrezeptorexpression auf den Dendritischen Zellen erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie:

Zuerst wurden DZs generiert (siehe 3.2.2.3), in hormonreduziertem Medium in einer Konzentration von  $10^6$  Zellen pro ml aufgenommen und schließlich in einer 96 well Rundbodenplatte a 100µl pro well für die Färbung ausgesät.

Gefärbt wurden der Progesteronrezeptor, der Androgenrezeptor sowie der Östrogenrezeptor  $\alpha$ . Da diese Rezeptoren allesamt intrazellulär exprimiert werden, mussten die Zellen zunächst fixiert und die Zellmembran permeabilisiert werden.

Zunächst wurden die Zellen einmal mit DPBS w/o Ca/Mg gewaschen.

Die Fixierung erfolgte mit Hilfe von 2% Paraformaldehyd (PFA):

Nach Zugabe von 100µl pro well 2% PFA wurden die Zellen für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend der Überstand nach Zentrifugation verworfen.

Für die Permeabilisierung der Zellen wurde Saponin verwendet:

Hierfür wurde zunächst eine Lösung mit 0,5% BSA und 0,5% Saponin angesetzt und a 100µl pro well auf die Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation von 20 Minuten bei Raumtemperatur.

Anschließend erfolgte die Färbung der Rezeptoren mit dem jeweiligen primären Antikörper.

Nach einer Inkubation von 40 Minuten bei Raumtemperatur und einem Waschschrift mit 0,5% BSA und 0,5% Saponin wurden die Zellen mit einem Fluorochrom gekoppelten sekundären Antikörper markiert, der an den primären Antikörper bindet.

Dabei wurde dieser zunächst 1:500 in FACS-Puffer mit 0,5% Saponin verdünnt und anschließend zu 20µl pro well auf das Zellpellet gegeben. Nach einer Inkubationsdauer von weiteren 40 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln und einem Waschschrift wurden die Zellen in 200µl FACS-Puffer aufgenommen und einer FACS-Analyse unterzogen.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms CellQuest (Becton Dickinson).

### 3.2.3.3 Analyse des Phänotyps und der Vitalität Dendritischer Zellen

Um mögliche Effekte von Sexualhormonen auf den Phänotyp von Dendritischen Zellen zu beleuchten, wurde die Expression verschiedener Reifungs- (CD1a, HLA-ABC, HLA-DR) und Aktivierungsmarker (CD80, CD83, CD86, CD40) mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Analysiert wurden sowohl unstimulierte Dendritische Zellen als auch DZs nach 24h Stimulation mit Geschlechtshormonen (siehe 3.2.2.4).

Dafür wurden etwa  $10^5$  Zellen pro well in eine 96 well Rundbodenplatte gegeben und zweimalig mit 200 $\mu$ l FACS-Puffer gewaschen. Es folgte die Färbung mit den Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern.

Nach 20 Minuten Inkubation bei 4°C wurden die Zellen ein weiteres Mal mit FACS-Puffer gewaschen, anschließend in 200 $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse erfolgte mit Hilfe des Programms CellQuest (Becton Dickinson).

Die Vitalität der Zellen wurde mittels Propidium-Iodid (PI) Färbung quantifiziert.

Hierfür wurden 10 $\mu$ l PI auf 200 $\mu$ l Zellsuspension gegeben. PI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der mit hoher Affinität an die DNA bindet. Da er außerdem nicht membrangängig ist, dringt der Farbstoff nur bei geschädigter Plasmamembran in die Zelle ein und kann somit zur Unterscheidung zwischen vitalen und nekrotischen Zellen verwendet werden.

#### 3.2.3.4 Intrazytoplasmatische Zytokinfärbung in T-Zellen

Die Analyse der intrazellulären Zytokinproduktion (IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-22, IL-4, IL-10) sowohl der T-Gedächtniszellen als auch der naiven T-Zellen erfolgte an Tag 7 des allogenen Lymphozytenstimulationstests (siehe 3.2.2.5).

Vor der durchflusszytometrischen Analyse waren folgende Schritte notwendig:

Schritt 1: Unspezifische Stimulation der intrazellulären Zytokinproduktion und Akkumulation der Proteine im Endoplasmatischen Retikulum

Hierfür wurden die Zellen zunächst in eine 24 well Platte überführt und die Zellsuspension mit hormonreduziertem Medium auf ein Volumen von 1080 $\mu$ l pro well aufgefüllt.

Es folgte die Stimulation der Zytokinsekretion durch Zugabe von 120 $\mu$ l Phorbol Myristate Acetate (PMA), welches zunächst 1:5000 vorverdünnt wurde (Stock 1mg/ml, 20ng/ml final im Ansatz) und 0,6 $\mu$ l Ionomycin.

Zusätzlich wurde 0,8 $\mu$ l Golgi Stop Lösung pro well zugegeben. Diese enthält den Protein Transport Inhibitor Monensin und führt zur Akkumulation der Proteine im Golgi Apparat /Endoplasmatischen Retikulum.

Nach einer Inkubation von 2 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden 1,2 $\mu$ l Golgi Stop (Brefeldin A) zugegeben und für weitere 4 Stunden inkubiert.

Brefeldin A ist ein Antibiotikum, welches den intrazellulären Proteintransport und die Sekretion von Proteinen über den Golgi Apparat hemmt, damit zur weiteren intrazellulären Anhäufung von Proteinen und somit auch zur Anhäufung von Zytokinen führt.

## Schritt 2: Fixierung und Permeabilisierung der Zellen

Um die nun intrazellulär akkumulierten Zytokine anfärben zu können, mussten die Zellen fixiert und permeabilisiert werden. Hierfür wurde das Cytofix/Cytoperm Plus Fixation/Permeabilization Kit (Becton Dickinson, Heidelberg) verwendet.

Die Zellen wurden zunächst in eine 96 well Rundbodenplatte überführt, abzentrifugiert, in 100µl pro well Fix/Perm Lösung aufgenommen und für 20min bei 4°C inkubiert.

Anschließend folgten zwei Waschschrte mit 200µl pro well Perm/Wash Puffer.

## Schritt 3: Zytokinfärbung und FACS-Analyse

Für die intrazelluläre Zytokinfärbung wurden zunächst Antikörpermixe in Perm/Wash Puffer hergestellt und a 50µl pro well auf das Zellpellet gegeben.

Nach einer Inkubation von 30min bei 4°C wurden die Zellen zweimal mit 200µl Perm/Wash Puffer gewaschen, in 300µl FACS-Puffer aufgenommen und einer FACS-Analyse unterzogen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms CellQuest (Becton Dickinson).

### 3.2.4 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Die Zytokinsekretion der Dendritischen Zellen und T-Zellen in den verschiedenen Experimenten wurde im zellfreien Überstand mittels ELISA quantifiziert.

Bei dieser Arbeit kamen sogenannte Sandwich ELISAs zur Anwendung:

Prinzipiell wird hierbei zunächst ein primärer Antikörper (coating Antikörper) gegen das zu analysierende Antigen (in diesem Fall das gewünschte Zytokin) an eine spezielle Oberfläche einer Mikrotiterplatte fest gebunden. Nicht benetzte Stellen dieser Platte werden durch Zugabe einer Proteinlösung belegt und somit eine unspezifische Bindung der Probe an die Platte verhindert.

Im nächsten Schritt werden die Probe und geeignete Standards aufgetragen.

Anschließend wird ein biotinierter zweiter Antikörper (detection Antikörper) hinzugegeben, der das Antigen an einer anderen Stelle bindet und somit das Sandwich komplettiert.

Das im darauffolgenden Schritt hinzugegebene Streptavidin-HRP (ein Konjugat aus Streptavidin und dem Enzym Horseradish Peroxidase) bindet an den detection Antikörper und setzt im letzten Schritt ein chromogenes Substrat um, was zu einer Farbbildung führt. Diese wird in einem Spektralphotometer (ELISA Reader MRX TC Revelation, Thermo Labsystems) in jedem well analysiert und kann anhand der verwendeten Standardreihe mit dem Gehalt des gesuchten Proteins (hier des Zytokins) korreliert werden.

Messung der Zytokinproduktion von Dendritischen Zellen:

Interleukin-23:

Die Sekretion von Interleukin-23 wurde mit Hilfe des IL-23 Ready-Set-Go! (eBioscience, San Diego, U.S.A) ELISA Kits untersucht. Verfahren wurde nach Protokoll des Herstellers.

Interleukin-6 und Interleukin-12:

Die Analyse der IL-6 und IL-12 Produktion wurde mit Hilfe eines Sandwich ELISAs wie folgt durchgeführt:

Im ersten Schritt wurden 96 well Mikrotiterplatten (Maxisorp, Nunc) mit dem Capture Antikörper (respective purified anti human IL-6 eBioscience oder human IL-12 p70 matched pair capture BD) beschichtet. Hierfür wurden die Capture Antikörper 1:250 in DPBS w/o Ca/Mg verdünnt und a 50µl pro well pipettiert.

Nach einer Inkubation von 1 Stunde bei 37°C und viermaligem Waschen mit Waschpuffer (0,05% Tween 20 in DPBS w/o Ca/Mg), wurden die Platten durch Zugabe von 100µl Blocking Puffer (DPBS w/o Ca/Mg mit 1% BSA) für 30 Minuten bei Raumtemperatur geblockt, um unspezifische Bindungen von Proteinen an die Platte zu verhindern.

Nach einem weiteren Waschschrift (viermal Waschen mit Waschpuffer) wurden die Proben und Standards a 50µl aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Während die Proben für den IL-12 ELISA unverdünnt pipettiert wurden, wurden die Proben für den IL-6 ELISA 1:100 in HuDZ Medium verdünnt.

Nach viermaligem Waschen der Platten wurde der biotinilierte detection Antikörper (respektive biotin conjugated anti human IL-6 oder biotin conjugated anti human IL-12p40/70) zunächst 1:500 in HuDZ Medium verdünnt und anschließend a 50µl pro well pipettiert (Inkubation 1 Stunde bei 37°C).

Anschließend wurde nach vier Waschschriften 50µl Streptavidin-HRP (GE Healthcare 1:5000 in Blocking Puffer) auf die Platten gegeben.

Nach einer dreistündigen Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln und sechsmal Waschen wurden die Platten entwickelt. Hierfür wurde eine Substratlösung bestehend aus 548µg/ml ABTS gelöst in Aqua ad injectabilia und 0,001% H2O2 in 0,1M Zitronensäure (pH 4,2) angesetzt und 100µl pro well pipettiert.

Die Farbreaktion wurde in einem Spektralphotometer (ELISA Reader MRX TC Revelation, Thermo Labsystems) quantifiziert und anhand der Standardreihe mit der Zytokinmenge korreliert.

Messung der Zytokinproduktion von T-Zellen:

IL-17 und Interferon- $\gamma$ :

Die Sekretion von IL-17 und Interferon- $\gamma$  der naiven T-Zellen und T-Gedächtniszellen wurde mit Hilfe der ELISA Kits IFN- $\gamma$  ELISA Ready-Set-Go! und IL-17A Ready-Set-Go! Human Interleukin-17A (beide eBioscience, San Diego, U.S.A) nach Protokoll des Herstellers nachgewiesen. Hierbei wurden die Proben für den IL-17 ELISA unverdünnt aufgetragen, die Proben für den IFN- $\gamma$  ELISA wurden 1:5 verdünnt.

IL-10 und IL-4:

Der Nachweis der IL-10 und IL-4 Produktion erfolgte nach Protokoll des Herstellers mit ELISA Kits von Becton Dickinson, Heidelberg (IL-4 Opt EIA Set Human IL-4 und IL-10 Opt EIA Set Human IL-10).

IL-22:

Die IL-22 Produktion wurde mit Hilfe des ELISA kits IL-22 human IL-22 (R&D, Wiesbaden) quantifiziert. Verfahren wurde nach Protokoll des Herstellers.

### 3.2.5 Proliferationsmessung

Der Einfluss von mit Sexualhormonen vorstimulierten Dendritischen Zellen auf die Proliferation von naiven T-Zellen und T-Gedächtniszellen wurde mit Hilfe des H3-Thymidin Tests untersucht:

Hierbei wurden die Zellen an Tag 4 (T-Gedächtniszellen) bzw. Tag 5 (naive T-Zellen) des allogenen Lymphozytenstimulationstests (siehe 3.2.2.5) zunächst mit 10 $\mu$ g/ml H3-Thymidin markiert und für 6 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Dabei tritt das radioaktiv markierte Thymidin in Konkurrenz mit dem unmarkierten Nukleotid und wird ohne Auslösung eines Kettenabbruchs in die neu synthetisierte DNA der Zellen eingebaut.

Anschließend wurde die Zellsuspension unter Verwendung eines Harvesters (Microbeta Filtermate Harvester, Perkin Elmer, Rodgau) durch ein Filterpapier (Printed Filtermat A Perkin Elmer, Rodgau) gesogen, wobei die Zellen in diesem zurückgehalten wurden.

Das Filterpapier wurde getrocknet und darauf folgend mit einem Festszintillator verschmolzen, was die Messung der Radioaktivität in einem  $\beta$ -counter ermöglichte.

Dabei korreliert die radioaktive Dosis (gemessen in counts per minute (cpm)) direkt mit der Menge an neu gebildeter DNA, was Rückschlüsse auf die Proliferationsaktivität der T-Zellen zulässt.

### 3.2.6 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe eines zweiseitigen Student'schen t-Tests für gepaarte Stichproben unter Verwendung der Rohdaten. Ein p-Wert von unter 0,05 wurde als statistisch signifikant eingestuft.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Etablierung des Zellkultursystems

#### 4.1.1 Etablierung des hormonreduzierten Kultursystems

Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Einflüsse von Sexualhormonen auf die Interaktion zwischen Dendritischen Zellen und T-Zellen zu untersuchen. Hierbei wurden die DZs mit unterschiedlichen Konzentrationen der Hormone 17 $\beta$ -Estradiol, Progesteron und Testosteron stimuliert und anschließend in einem allogenen Lymphozytenstimulationstest mit allogenen T-Zellen kokultiviert.

Um Effekte der Hormone auch im physiologischen Konzentrationsbereich effektiv analysieren zu können, war es notwendig, ein Kultursystem zu etablieren, welches möglichst frei von Sexualhormonen ist. Dabei sollte die Vitalität und Funktion sowohl der Dendritischen Zellen als auch der T-Zellen möglichst wenig beeinträchtigt werden.

Sowohl das normalerweise zur Generierung von Dendritischen Zellen verwendete HuDZ Medium als auch das bei dem allogenen Lymphozytenstimulationstest verwendete Proliferationsmedium (siehe 3.1.5) erwiesen sich hierbei als ungeeignet, da sowohl bovines Serum als auch humanes Serum bereits Geschlechtshormone in relativ hohen Konzentrationen enthalten (siehe Tabelle 4.1-1).

Getestet wurden infolgedessen serumfreie Medien auf Basis von humanem Serum Albumin (Sigma-Aldrich, München) sowie ein hormonreduziertes Medium mit Charcoal/Dextran vorbehandeltem fetalem Kälberserum (Hyclone, Utah). Da der häufig in Zellkulturmedien enthaltene pH-Indikator Phenolrot signifikante östrogenartige Wirkungen aufweist, wurde IMDM Medium ohne Phenolrot (Invitrogen, Paisley, Scotland) verwendet.

	FBS	Charcoal/Dextran Treated FBS (Hyclone)
17- $\beta$ -Estradiol	2,4x10 <sup>-9</sup> M	3,7x10 <sup>-12</sup> M
Testosteron	1,5x10 <sup>-9</sup> M	1,0x10 <sup>-10</sup> M
Progesteron	3,0x10 <sup>-9</sup> M	3,0x10 <sup>-9</sup> M

Tab. 4.1-1. Stoffmengenkonzentration von Sexualhormonen in bovinem Serum (FBS) und in Charcoal/Dextran vorbehandeltem fetalem Kälberserum (Stephens et al. 2006).

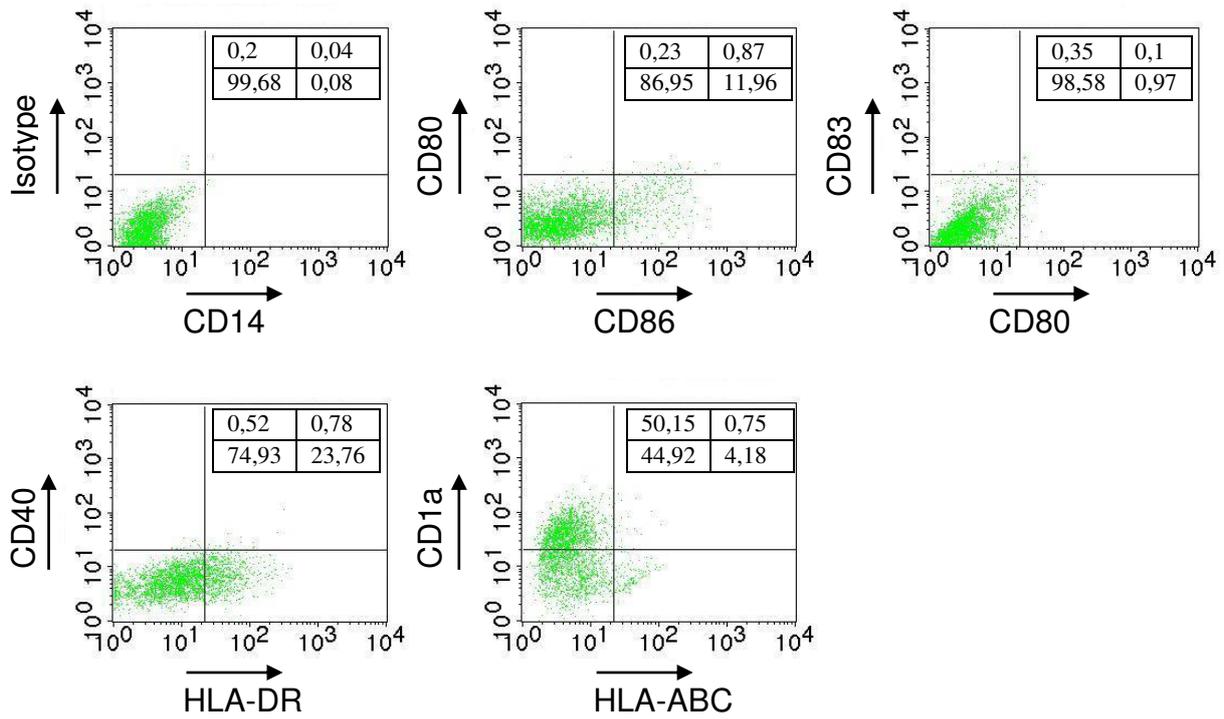
Die Viabilität der Dendritischen Zellen wurde mittels Propidium-Iodid-Färbung bestimmt.

Zur Beurteilung der Reifung und Funktion wurden die Zellen im Durchflusszytometer auf typische Reifungs- (CD1a, HLA-ABC, HLA-DR) und Aktivierungsmarker (CD80, CD83, CD86,

CD40) untersucht sowie die LPS (100ng/ml) induzierte Produktion der Zytokine IL-12, IL-6 und IL-23 gemessen.

Nach 5 bis 6 Tagen in Kultur in hormonreduziertem Medium zeigte der Phänotyp der Dendritischen Zellen in der durchflusszytometrischen Analyse eine deutlich bessere Ausprägung des charakteristischen Musters für unreife DZs (siehe Abbildung 4.1-1): Die Zellen waren CD14-negativ und zeigten niedrige Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD80 und CD86.

A: DZ Phänotypisierung in serumfreiem Medium



B: DZ Phänotypisierung in hormonreduziertem Medium

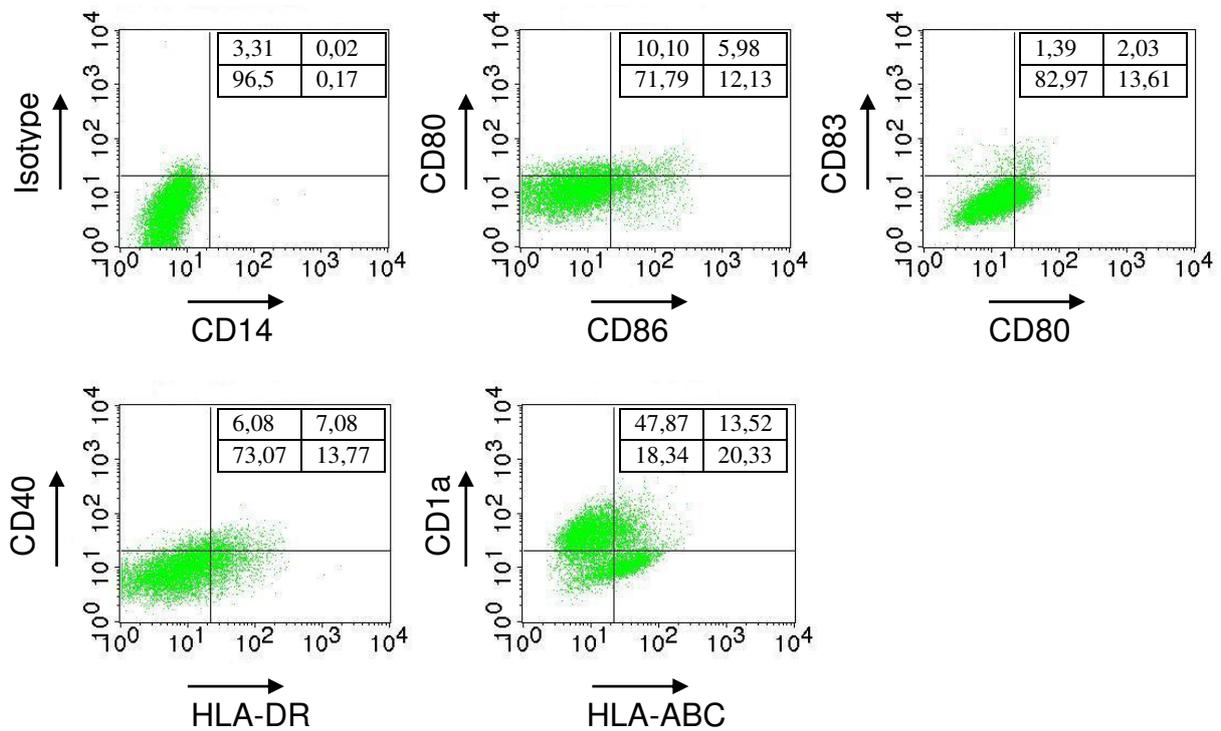
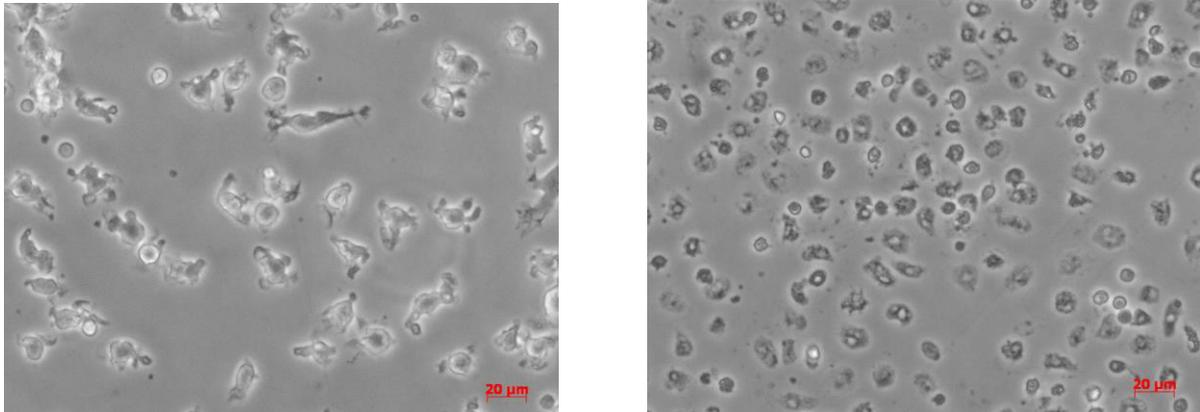


Abb. 4.1-1. Durchflusszytometrische Phänotypisierung der Dendritischen Zellen nach 6 Tagen Kultur in A: serumfreiem Medium und B: hormonreduziertem Medium.

Unter lichtmikroskopischer Betrachtung bestätigte sich die Oberflächencharakterisierung in einer deutlich besseren Ausbildung der Morphologie und in einem vermehrten Überleben bei Verwendung von hormonreduziertem Medium (siehe Abbildung 4.1-2).



*Abb. 4.1-2. Lichtmikroskopisches Bild der Dendritischen Zellen nach 6 Tagen Kultur in hormonreduziertem (linkes Bild) und serumfreiem Medium (rechtes Bild).*

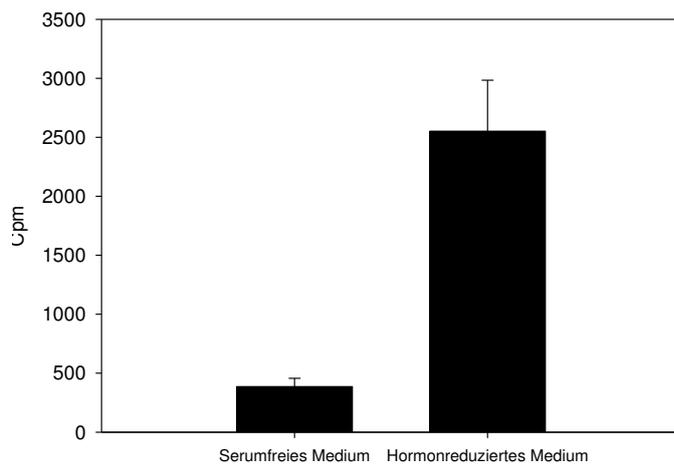
Die durchflusszytometrische Quantifizierung der Vitalität mittels Propidium-Iodid-Färbung bestätigte das Bild des besseren Überlebens bei Verwendung von hormonreduziertem Medium:

Während im serumfreien Medium nach 6 Tagen Kultur in fünf unabhängigen Experimenten durchschnittlich  $55,42\% \pm 9,16\%$  der LPS stimulierten DZs überlebten, konnte in hormonreduziertem Medium (auf Basis von Charcoal/Dextran vorbehandeltem fetalem Kälberserum) ein Überleben von  $89,80\% \pm 1,70\%$  erreicht werden ( $n=9$ ).

Die Analyse der Zytokinproduktion der DZs nach 24 stündiger LPS Stimulation mittels ELISA zeigte ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den beiden Medien:

In serumfreiem Medium konnte in fünf unabhängigen Experimenten weder das Th17-assoziierte Zytokin Interleukin-23, noch das Th1-Zytokin Interleukin-12 nachgewiesen werden. Die Interleukin-6 Produktion war mit 955pg/ml bis zu 2693pg/ml vergleichsweise niedrig.

In der Folge waren diese in serumfreiem Medium generierten Dendritischen Zellen in zwei unabhängigen Experimenten nicht in der Lage, T-Gedächtniszellen im Rahmen eines allogenen Lymphozytenstimulationstests zu stimulieren. Es konnten keine T-Zell spezifischen Zytokine wie IL-17, IFN- $\gamma$ , IL-22 nachgewiesen werden und die Zellen proliferierten kaum (siehe Abb. 4.1-3). Somit erwies sich dieses Medium für diese Untersuchungen als ungeeignet.



*Abb. 4.1-3. Proliferationsaktivität von T-Gedächtniszellen nach 4 Tagen Koinkubation mit LPS vorstimulierten DZs in serumfreiem Medium (links n=1) und hormonreduziertem Medium (rechts n=6).*

In hormonreduziertem Medium generierte Dendritische Zellen produzierten dagegen IL-23 in acht von zehn unabhängigen Experimenten in Konzentrationen von 34pg/ml bis zu 564pg/ml und IL-12 in fünf von zehn unabhängigen Experimenten in Konzentrationen von 28 bis zu 404pg/ml. IL6 konnte in allen Experimenten in hohen Konzentrationen von 18646pg/ml bis zu 181000pg/ml nachgewiesen werden.

Darüber hinaus waren diese Zellen in der Lage, naive T-Zellen und T-Gedächtniszellen in allogenen Lymphozytenstimulationstests zu stimulieren.

Die Zytokinproduktion der DZs war in diesem Medium somit zwar deutlich geringer als in konventionell verwendetem HuDZ Medium, jedoch zeigte sich vor allem bei Zellstimulationen mit physiologischen Konzentrationen von Sexualhormonen ein deutlich vergrößertes Analysefenster (siehe Abb. 4.1-4), sodass dieses Medium einen guten Kompromiss zwischen „Hormonkontamination“ und Zustand der Dendritischen Zellen darstellte und deswegen für alle weiteren Experimente verwendet wurde.

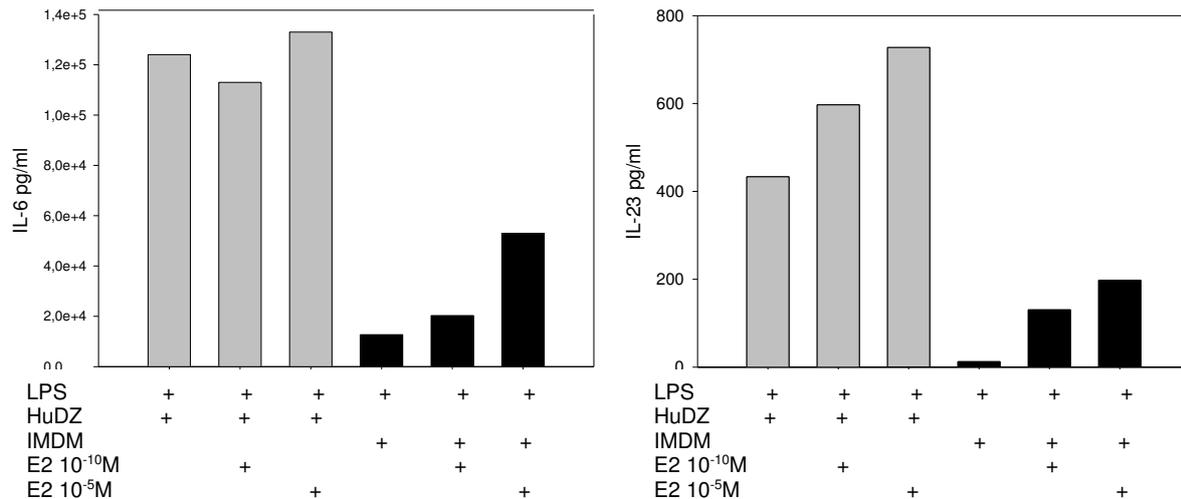


Abb. 4.1-4. Interleukin-6 (linkes Bild) und Interleukin-23 Produktion (rechtes Bild) Dendritischer Zellen: DZs wurden nach 6 Tagen Kultur in HuDZ Medium (grau hinterlegt) oder hormonreduziertem Medium (IMDM+10%Charcoal/Dextran treated FCS) mit LPS (100ng/ml) und 17 $\beta$ -Estradiol (E2) in physiologischer ( $10^{-10}$ M) und pharmakologischer Konzentration ( $10^{-5}$ M) für 24 Stunden stimuliert. Die Zytokinproduktion wurde mittels ELISA quantifiziert (Angabe in Pikogramm pro Milliliter) n=1.

#### 4.1.2 Einfluss des Lösungsmittels Ethanol

Die für die Stimulation der Dendritischen Zellen verwendeten Sexualhormone 17 $\beta$ -Estradiol, Progesteron und Testosteron lagen allesamt in Pulverform vor und wurden in Ethanol absolute in einer Stocklösung von  $10^{-2}$ M angelöst (siehe 3.2.1).

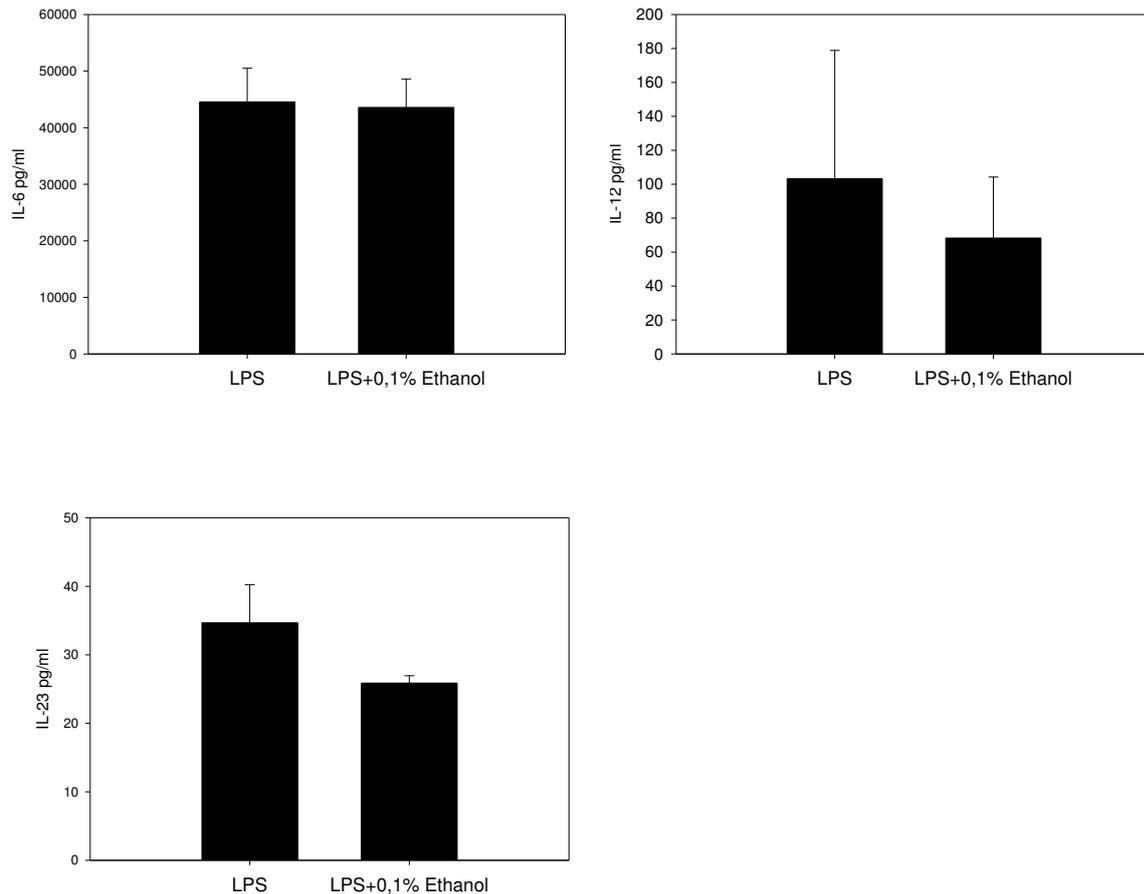
Da mit unterschiedlich hohen Hormonkonzentrationen von  $10^{-10}$ M bis zu  $10^{-5}$ M stimuliert wurde, war es wichtig auch die alleinige Wirkung des Lösungsmittels auf die Reifung und die Funktion der Dendritischen Zellen zu untersuchen, um mögliche Effekte berücksichtigen zu können.

Hierfür wurden Dendritische Zellen an Tag 6 geerntet und mit der höchsten eingesetzten Konzentration von 0,1% Ethanol im Ansatz stimuliert. Untersucht wurde der direkte Einfluss auf die Zytokinsekretion der Dendritischen Zellen sowie der indirekte Einfluss auf die Proliferation und Zytokinsekretion von T-Gedächtniszellen und naiven T-Zellen in einem allogenen Lymphozytenstimulationstest.

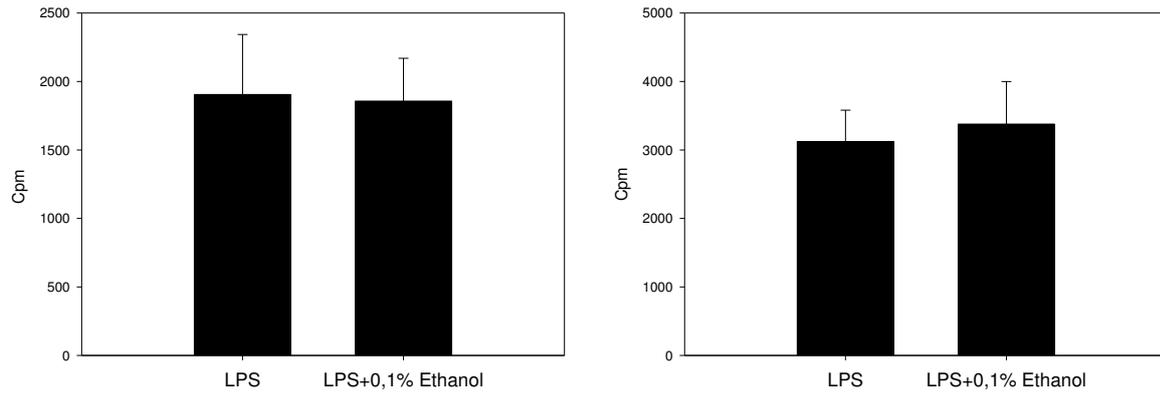
Hierbei zeigte sich kein signifikanter Effekt in der alleinigen Stimulation mit 0,1% Ethanol (siehe Abb. 4.1-5 und 4.1-6).

Niedrigere Konzentrationen im Ansatz wurden als vernachlässigbar eingestuft, es wurden jedoch in den meisten Experimenten Kontrollen mitgeführt.

Ethanol erwies sich somit als geeignetes Lösemittel mit allenfalls geringen, in jedem Fall nicht signifikanten Effekten auf die Funktion der Dendritischen Zellen und wurde in allen weiteren Experimenten verwendet. Dabei wurde bei den Hormonstimulationen auf die vorhandene Ethanolkontrolle bezogen.



**Abb. 4.1-5. Effekte von Ethanol auf die Zytokinsekretion Dendritischer Zellen:**  
 DZs wurden für 24h mit LPS (100ng/ml) sowie zusätzlich mit 0,1% Ethanol stimuliert und die Zytokine IL-6, IL-12 und IL-23 mittels ELISA quantifiziert (Angabe in Pikogramm pro Milliliter).  
 IL-6: Mittelwerte  $\pm$  SEM von 5 unabhängigen Experimenten.  
 IL-12: Mittelwerte  $\pm$  SEM von 2 unabhängigen Experimenten.  
 IL-23: Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 unabhängigen Experimenten.



*Abb. 4.1-6. Proliferationsaktivität von T-Gedächtniszellen (linke Abb. n=2) und naiven T-Zellen (rechte Abb. n=3) nach 4 Tagen Koinkubation mit LPS und LPS+0,1% Ethanol vorstimulierten DZs.*

## 4.2 Expression von Sexualhormonrezeptoren auf Dendritischen Zellen

Da Sexualhormone in physiologischen Konzentrationen vorwiegend über genomische, rezeptorvermittelte Signalwege wirken, erfolgten Färbungen auf die intrazellulär exprimierten Hormonrezeptoren in unstimulierten Dendritischen Zellen. Hierbei konnten der Androgenrezeptor sowie der Östrogenrezeptor  $\alpha$  nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.2-1). Die Expression des Androgenrezeptors erschien hierbei deutlich geringer als die des Östrogenrezeptors.

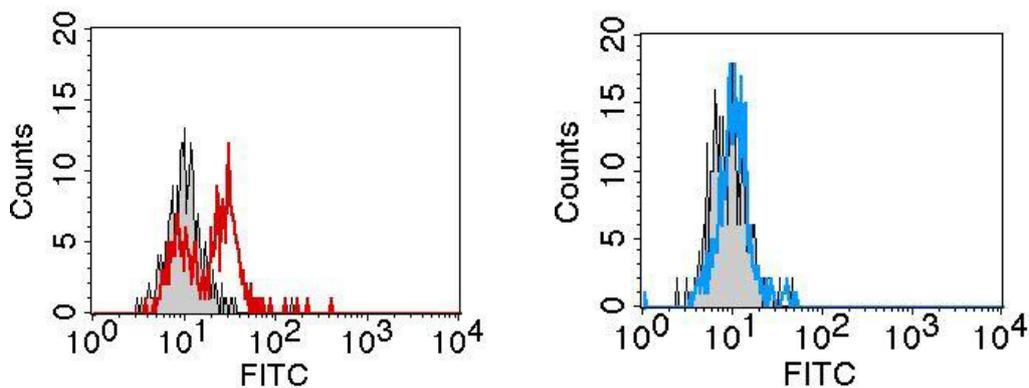


Abb. 4.2-1. Intrazelluläre Färbung des Östrogenrezeptors  $\alpha$  (linkes Bild) und des Androgenrezeptors (rechtes Bild) in Dendritischen Zellen. Die Färbung erfolgte nach 6 Tagen Kultur in hormonreduziertem Medium. Gezeigt sind Histogramme der mittleren Fluoreszenzintensitäten nach Rezeptorfärbung (farbig gekennzeichnet) gegenüber der Isotype (grau hinterlegt).

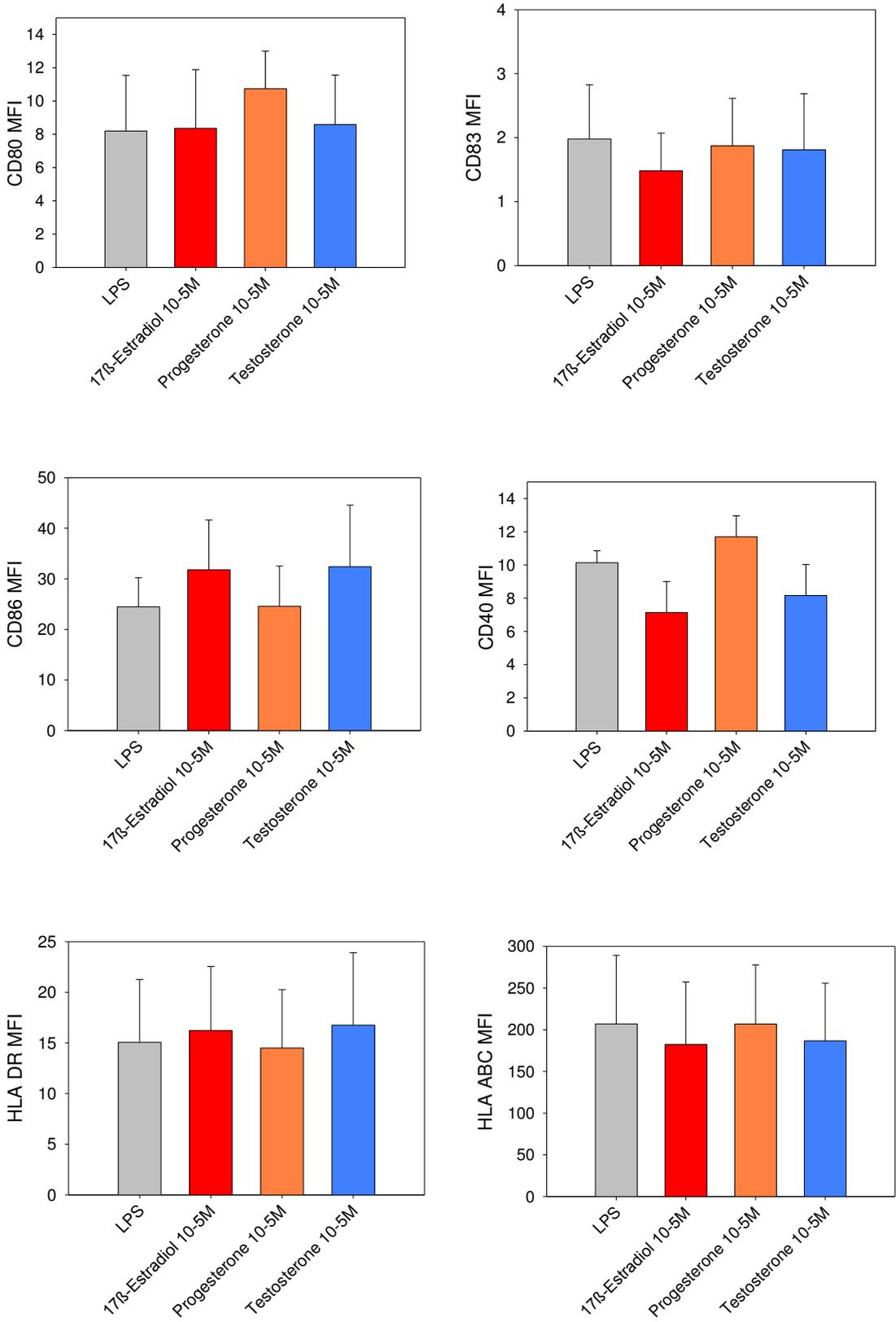
## 4.3 Direkte Effekte von Sexualhormonen auf Dendritische Zellen

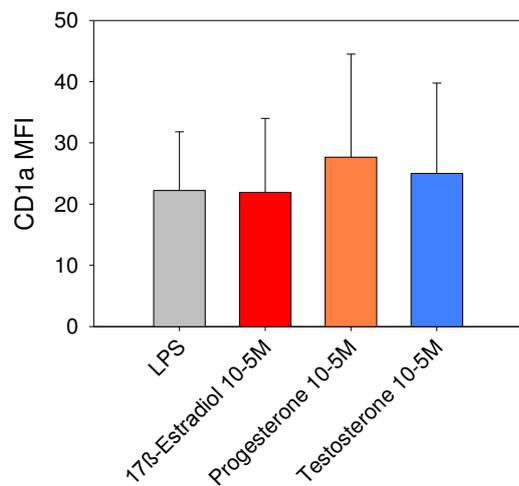
### 4.3.1 Effekte von Sexualhormonen auf das Oberflächenrezeptorprofil Dendritischer Zellen

Um mögliche Effekte von Sexualhormonen auf die Reifungs- (CD1a, HLA-ABC, HLA-DR) und Aktivierungsmarker (CD80, CD83, CD86, CD40) von Dendritischen Zellen nachzuweisen, wurden diese mit hohen pharmakologischen Konzentrationen ( $10^{-5}M$ ) von Progesteron,  $17\beta$ -Estradiol und Testosteron in hormonreduziertem Medium stimuliert und nach 24 Stunden einer durchflusszytometrischen Analyse unterzogen.

Da die alleinige Gabe von Sexualhormonen nicht zu einer Hochregulierung der Expression der Reifungs- und Aktivierungsmarker führte, wurden die DZs zusätzlich jeweils mit LPS (100ng/ml) stimuliert. Insgesamt zeigte sich eine geringe Ausprägung der Aktivierungsmarker CD80, CD83, CD86 und CD40. Es waren keine additiven Effekte von Sexualhormonen über den LPS Effekt hinaus zu beobachten. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den

Reifungsmarkern: Vor allem HLA-DR und CD1a waren gering ausgeprägt und ließen sich wie auch HLA-ABC nicht signifikant durch Sexualhormone beeinflussen (siehe Abbildung 4.3-1).





*Abb. 4.3-1. Effekte von Sexualhormonen auf den Phänotyp Dendritischer Zellen: DZs wurden an Tag 6 mit pharmakologischen Konzentrationen ( $10^{-5}M$ ) der Hormone  $17\beta$ -Estradiol, Progesteron und Testosteron sowie zusätzlich mit LPS (100ng/ml) stimuliert und nach 24h einer durchflusszytometrischen Analyse unterzogen. Gezeigt ist die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) von 4 unabhängigen Experimenten.*

#### 4.3.2 Effekte von Sexualhormonen auf die Zytokinsekretion Dendritischer Zellen

Der Einfluss von Sexualhormonen auf die Zytokinsekretion Dendritischer Zellen wurde mittels ELISA untersucht: Hierbei wurden die Zellen für 24 Stunden mit und ohne LPS (100ng/ml) und unterschiedlichen Konzentrationen der Sexualhormone Progesteron, 17 $\beta$ -Estradiol und Testosteron in einer 12 well Platte stimuliert. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Zytokine IL-6, IL-12 und IL-23 aus zellfreiem Überstand.

Dabei hatte die alleinige Stimulation mit Sexualhormonen keine Effekte auf die DZs, sodass im Folgenden additive Effekte mit LPS (100ng/ml) untersucht wurden.

Für die Stimulationen wurde zunächst eine Konzentration im physiologischen Bereich (17 $\beta$ -Estradiol  $10^{-10}$ M, Testosteron  $10^{-10}$ M, Progesteron  $10^{-9}$ M) ausgewählt. In diesen Konzentrationen wirken die Sexualhormone vermehrt über genomische, rezeptorvermittelte Wege.

Nach Stimulation mit LPS (100ng/ml) und der entsprechenden Ethanolkontrolle sezernierten die Zellen Interleukin-12 in Konzentrationen von  $158,09 \pm 67,77$ pg/ml (Kontrolle für Stimulationen mit der Konzentration  $10^{-10}$ M) und  $140,983 \pm 67,4$ pg/ml (Kontrolle  $10^{-9}$ M).

Die Interleukin-23 Produktion betrug  $150,46 \pm 72,64$ pg/ml (Kontrolle  $10^{-10}$ M) sowie  $148,39 \pm 73,16$ pg/ml (Kontrolle  $10^{-9}$ M). Die Messung der Interleukin-6 Produktion ergab Werte von  $62912 \pm 16040,5$ pg/ml (Kontrolle  $10^{-10}$ M) und  $64380 \pm 15815,1$ pg/ml (Kontrolle  $10^{-9}$ M).

In Bezug auf diese Kontrollen zeigte sich eine Induktion des Th1-assoziierten Zytokins IL-12 durch 17 $\beta$ -Estradiol ( $p=0,45$ , nicht signifikant), während Testosteron hemmend wirkte ( $p=0,056$ , nicht signifikant). Progesteron zeigte in diesem Zusammenhang keinen Effekt (siehe Abbildung 4.3-2).

In der Sekretion der Th17-assoziierten Zytokine IL-23 und IL-6 ließen sich kaum Effekte beobachten. Allenfalls nach Stimulation mit Testosteron zeigte sich eine leichte Hemmung der IL-23 Sekretion sowie eine Induktion der IL-6 Ausschüttung (siehe Abbildung 4.3-2).

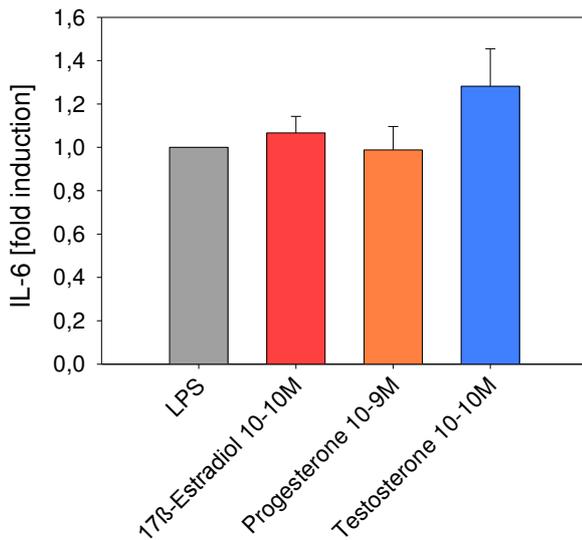
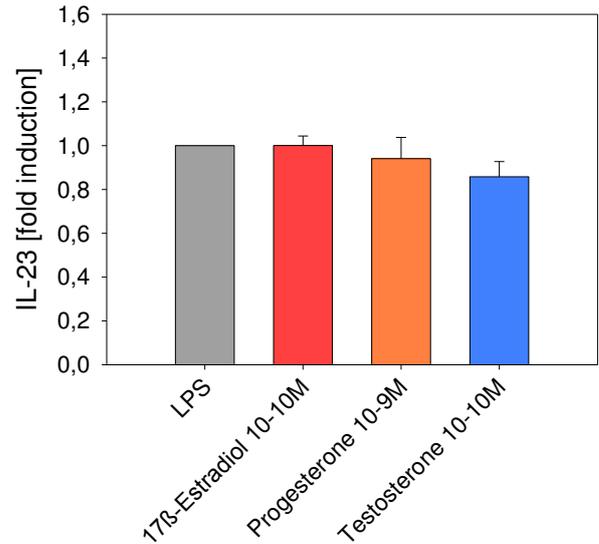
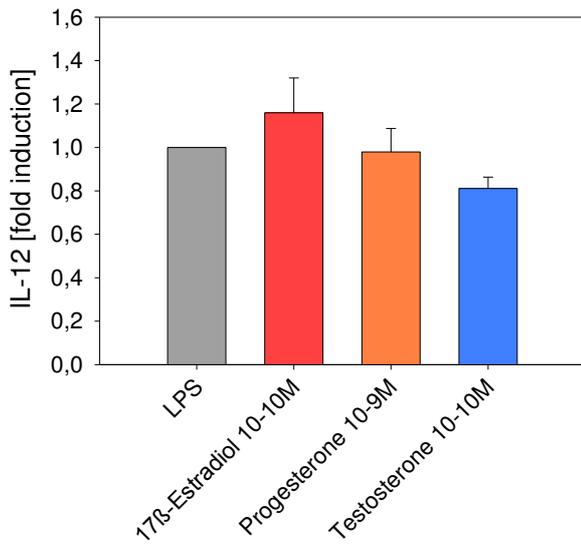


Abb. 4.3-2. Effekte von Sexualhormonen auf die Zytokinsekretion Dendritischer Zellen. DZs wurden für 24h mit LPS (100ng/ml) sowie physiologischen Hormonkonzentrationen stimuliert und die Zytokine IL-12, IL-23 und IL-6 mittels ELISA quantifiziert. Gezeigt ist die relative Induktion (fold induction) gegenüber der LPS/Ethanolkontrolle, die gleich 1,0 gesetzt wurde.  
 IL-12: Mittelwerte  $\pm$  SEM von 5 unabhängigen Experimenten.  
 IL-23: Mittelwerte  $\pm$  SEM von 7 unabhängigen Experimenten.  
 IL-6: Mittelwerte  $\pm$  SEM von 10 unabhängigen Experimenten.

Im nächsten Schritt wurden Stimulationen mit hohen pharmakologischen Konzentrationen (17 $\beta$ -Estradiol 10<sup>-5</sup>M, Testosteron 10<sup>-5</sup>M, Progesteron 10<sup>-5</sup>M) vorgenommen.

Die Sexualhormone wirken hierbei vorwiegend über rezeptorunabhängige nicht genomische Wege.

Die Zytokinsekretion nach Stimulation mit LPS (100ng/ml) und der Ethanolkontrolle (10<sup>-5</sup>M Ethanol absolute) betrug 228,93  $\pm$  149,72pg/ml (IL-12), 155,2  $\pm$  129,33pg/ml (IL-23) und 53527,86  $\pm$  8841,14pg/ml (IL-6).

Dabei konnte wiederum, in Bezug auf diese Kontrollen, eine deutliche Induktion von IL-12 durch 17 $\beta$ -Estradiol beobachtet werden. Ein Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht ( $p=0,097$ ). Nach Stimulation mit Progesteron und Testosteron waren keine Effekte zu sehen (siehe Abbildung 4.3-3).

Im Gegensatz zu den Stimulationen mit physiologischen Konzentrationen zeigte sich bei IL-23 eine Induktion durch alle Sexualhormone. Die IL-6 Sekretion wurde signifikant durch 17 $\beta$ -Estradiol ( $p=0,031$ ) und durch Testosteron ( $p=0,035$ ) gesteigert (siehe Abbildung 4.3-3).

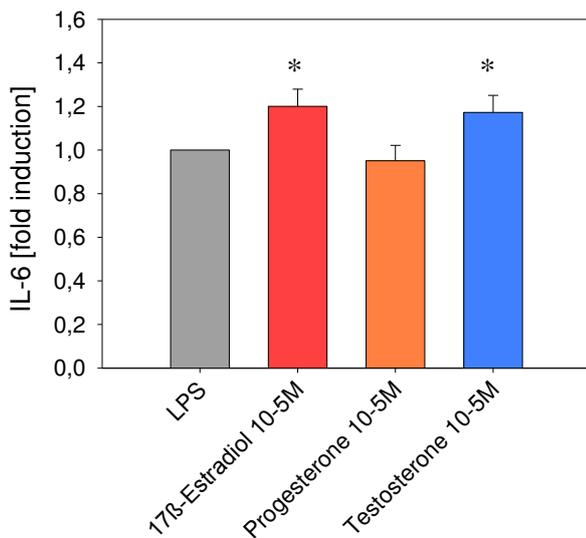
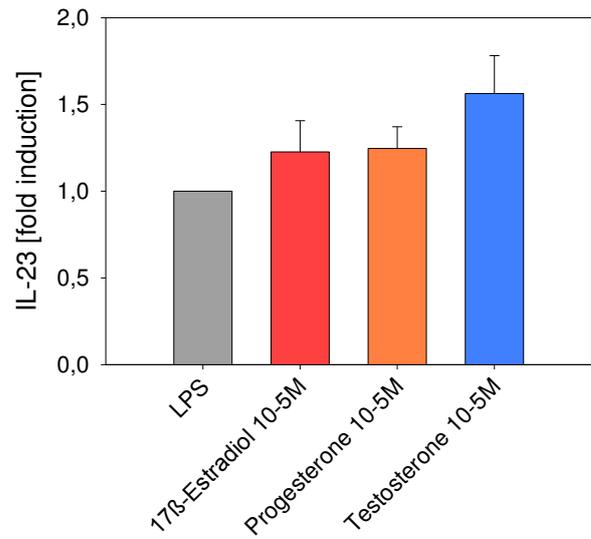
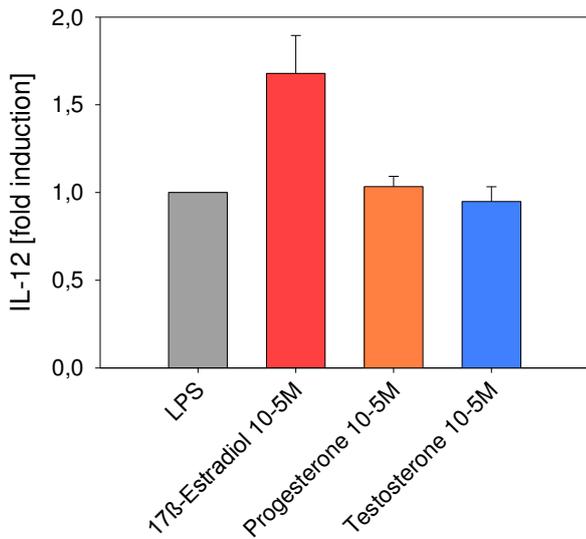


Abb. 4.3-3. Effekte von Sexualhormonen auf die Zytokinsekretion Dendritischer Zellen. DZs wurden für 24h mit LPS (100ng/ml) und pharmakologischen Hormonkonzentrationen stimuliert und die Zytokine IL-12, IL-23 und IL-6 mittels ELISA quantifiziert. Gezeigt ist die relative Induktion (fold induction) gegenüber der LPS/Ethanolkontrolle (gleich 1,0 gesetzt). \* =  $p < 0,05$  gepaarter t-Test.  
 IL-12: Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 unabhängigen Experimenten.  
 IL-23: Mittelwerte  $\pm$  SEM von 4 unabhängigen Experimenten.  
 IL-6: Mittelwerte  $\pm$  SEM von 6 unabhängigen Experimenten.

## 4.4 Allogener Lymphozytenstimulationstest

### 4.4.1 Indirekte Effekte von Sexualhormonen auf T-Gedächtniszellen

Um zu untersuchen, ob die mit Sexualhormonen vorbehandelten Dendritischen Zellen die Immunantwort in allogenen CD4-positiven T-Gedächtniszellen beeinflussen, wurde ein allogener Lymphozytenstimulationstest durchgeführt (siehe 3.2.2.5). Dabei wurden die vorstimulierten Dendritischen Zellen zwei- bis dreimal mit DPBS w/o Ca/Mg gewaschen und jeweils zu einer Ratio von 1:10 (10.000 DZs, 100.000 T-Zellen pro well, angesetzt zu Triplikaten in einer 96 well Flachbodenplatte) zu den T-Zellen gegeben. Dadurch kam es nicht zu direktem Kontakt von T-Zellen mit den Hormonen.

Nach einer Inkubationszeit von 4 Tagen wurde zunächst die Proliferationsaktivität der T-Zellen mit Hilfe des H3-Thymidin-Tests untersucht (siehe 3.2.5).

Dabei zeigte sich nach Kokultur von T-Gedächtniszellen mit Dendritischen Zellen, die mit physiologischen Sexualhormonkonzentrationen vorstimuliert wurden, eine Induktion der Proliferationsaktivität vor allem durch 17 $\beta$ -Estradiol und Testosteron (siehe Abbildung 4.4-1). Dieser Effekt verstärkte sich bei Verwendung von pharmakologischen Sexualhormonkonzentrationen, wobei nun auch Progesteron stimulierend wirkte (siehe Abbildung 4.4-1). Dabei steigerte 17 $\beta$ -Estradiol die Proliferation signifikant ( $p=0,0236$ ).

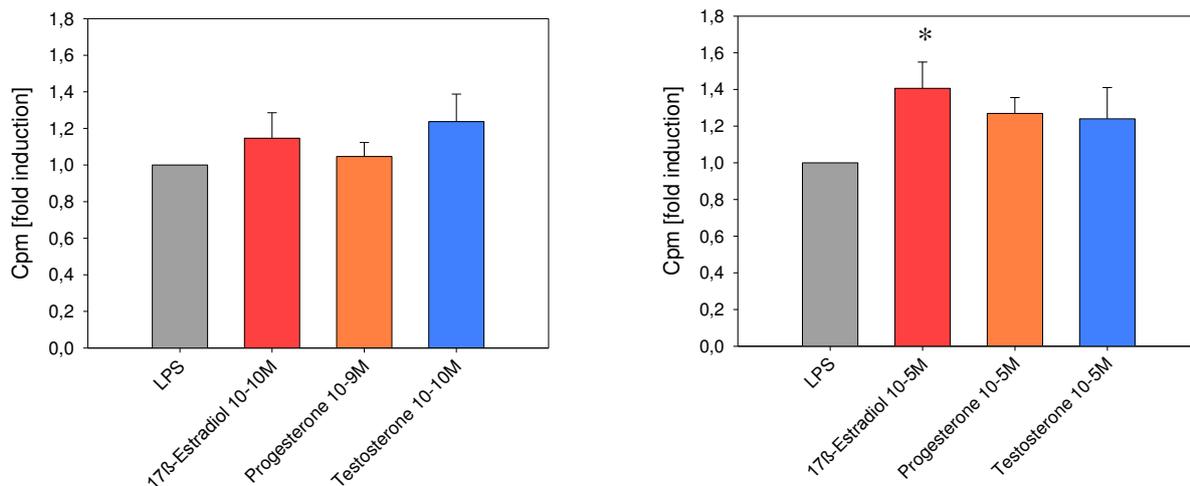


Abb. 4.4-1. Proliferationsaktivität von T-Gedächtniszellen nach 4 Tagen Koinkubation mit vorstimulierten DZs. Gezeigt ist die relative Induktion gegenüber der LPS/Ethanolkontrolle (gleich 1,0 gesetzt): 2565,56 ± 425,27cpm (Kontrolle 10<sup>-10</sup>M), 2601,61 ± 418,44cpm (Kontrolle 10<sup>-9</sup>M), 2535,95 ± 422,26cpm (Kontrolle 10<sup>-5</sup>M). Stimulation der DZs mit physiologischen (linkes Bild) und pharmakologischen (rechtes Bild) Sexualhormonkonzentrationen. \* = p<0,05 gepaarter t-Test. Mittelwerte ± SEM von 6 unabhängigen Experimenten.

Parallel zu der Messung der Proliferationsaktivität der T-Zellen nach 4 Tagen Inkubationszeit wurde der zellfreie Überstand der Kokultur auf Th17 (IL-17, IL-22), Th1 (IFN-γ), Treg (IL-10) und Th2 (IL-4) assoziierte Zytokine hin untersucht. Der Nachweis möglicher indirekter Effekte der vorstimulierten DZs auf die Zytokinsekretion der T-Gedächtniszellen wurde mittels ELISA quantifiziert.

Nach Vorstimulation der DZs mit 100ng/ml LPS und der jeweiligen Ethanolkontrolle sezernierten die T-Zellen niedrige Konzentrationen von Interferon-γ: 252,27 ± 125,82pg/ml (Kontrolle 10<sup>-10</sup>M), 251,73 ± 126,09pg/ml (Kontrolle 10<sup>-9</sup>M) und 283,83 ± 224,635pg/ml (Kontrolle 10<sup>-5</sup>M).

Die Interleukin-17 Produktion betrug 57,51 ± 20,1pg/ml (Kontrolle 10<sup>-10</sup>M), 64,54 ± 21,13 pg/ml (Kontrolle 10<sup>-9</sup>M) und 64,53 ± 1,84pg/ml (Kontrolle 10<sup>-5</sup>M).

Die Interleukin-22 Sekretion erreichte Werte von 237,89 ± 119,85pg/ml (Kontrolle 10<sup>-10</sup>M), 231,79 ± 121,99pg/ml (Kontrolle 10<sup>-9</sup>M) und 101,28 ± 23,63pg/ml (Kontrolle 10<sup>-5</sup>M).

Die Interleukin-10 Ausschüttung betrug 140,68 ± 69,22pg/ml (Kontrolle 10<sup>-10</sup> M), 139,17 ± 69,40pg/ml (Kontrolle 10<sup>-9</sup> M) und 224,49 ± 142,41pg/ml (Kontrolle 10<sup>-5</sup> M).

Aus Abbildung 4.4-2 geht hervor, dass physiologische Hormonkonzentrationen die Interferon- $\gamma$  und IL-10 Produktion induzierten. Die IL-17 Produktion wurde vor allem durch 17 $\beta$ -Estradiol und Testosteron stimuliert, während die IL-22 Sekretion vor allem durch Progesteron gesteigert wurde. Ein Signifikanzniveau wurde jedoch bei allen Induktionen verfehlt.

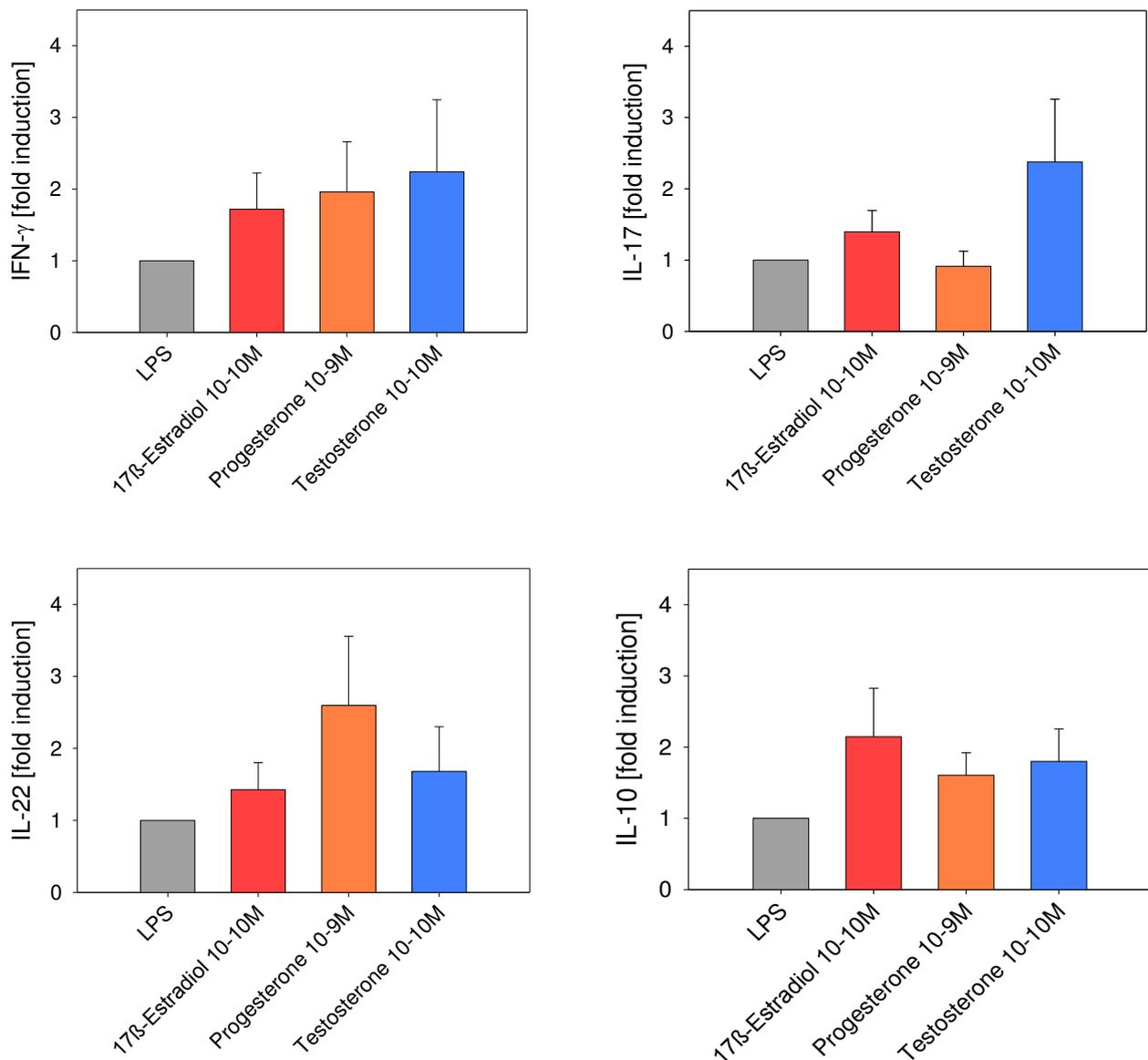


Abb. 4.4-2. Zytokinproduktion von T-Gedächtniszellen nach 4 Tagen Koinkubation mit vorstimulierten DZs. Gezeigt ist die relative Induktion gegenüber der LPS/Ethanolkontrolle nach Stimulation der DZs mit physiologischen Sexualhormonkonzentrationen. Mittelwerte  $\pm$  SEM von 4 (IL-17, IFN- $\gamma$ ) bzw. 5 (IL-22, IL-10) unabhängigen Experimenten.

Das Bild nach Anwendung von pharmakologischen Sexualhormonkonzentrationen zeigte analog eine verstärkte Induktion von Interferon- $\gamma$  durch alle Hormone, wobei Progesteron hier den stärksten Effekt aufwies. Die IL-17 Sekretion wurde in geringem Maße vor allem durch Progesteron gesteigert, während die IL-22 und IL-10 Produktion kaum beeinflusst wurden (siehe Abbildung 4.4-3). Auch diese Effekte waren nicht signifikant.

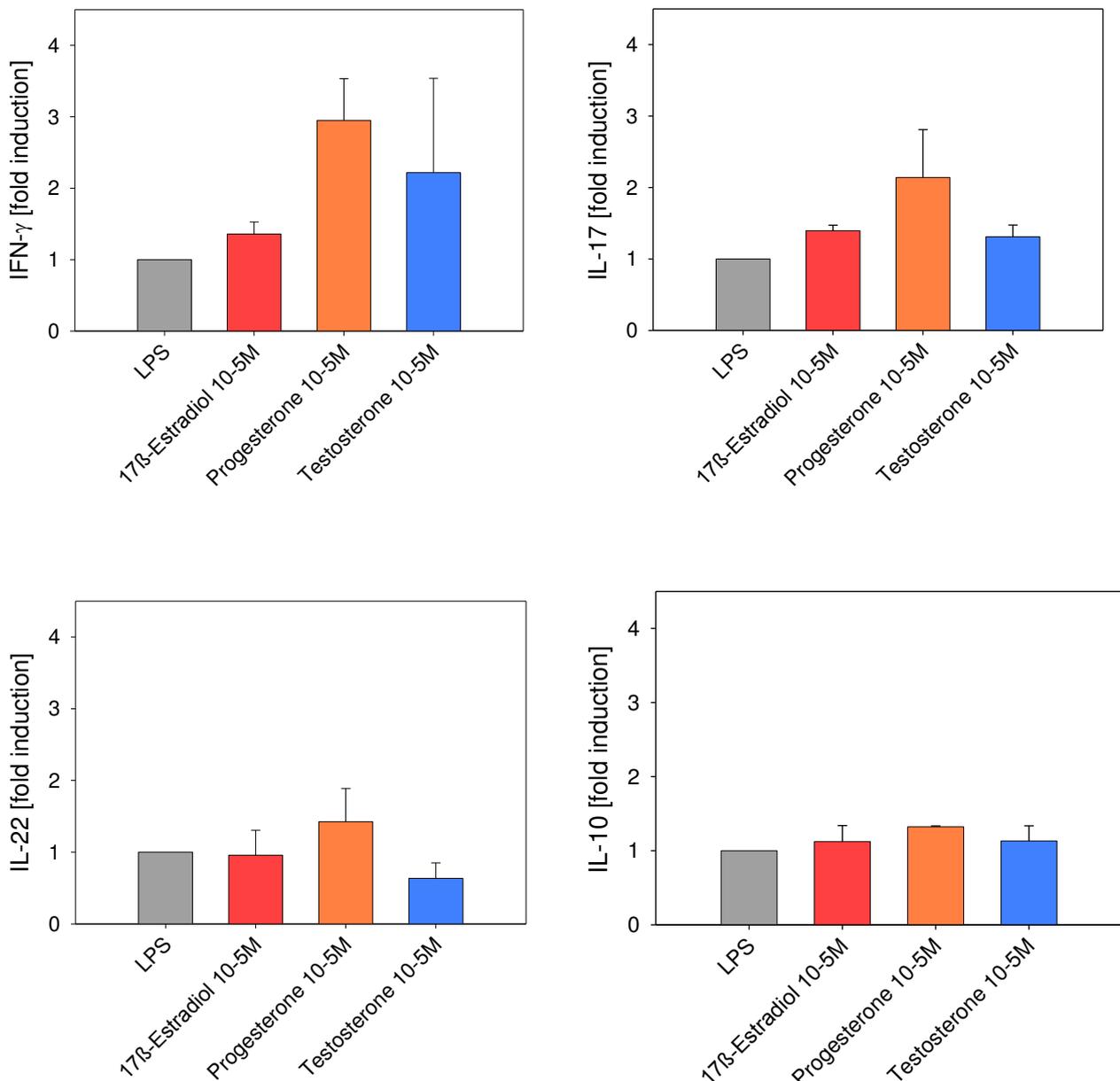


Abb. 4.4-3. Zytokinproduktion von T-Gedächtniszellen nach 4 Tagen Koinkubation mit vorstimulierten DZs. Gezeigt ist die relative Induktion gegenüber der LPS/Ethanolkontrolle nach Stimulation der DZs mit pharmakologischen Sexualhormonkonzentrationen. Mittelwerte  $\pm$  SEM von 2 unabhängigen Experimenten.

Interleukin-4 konnte in keinem Experiment im zellfreien Überstand nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Um genauere Erkenntnisse über den Einfluss der vorstimulierten Dendritischen Zellen auf das Zytokinprofil und die Polarisation von T-Gedächtniszellen zu erlangen, erfolgte an Tag 7 des allogenen Lymphozytenstimulationstests eine intrazytoplasmatische Zytokinfärbung (siehe 3.2.3.4). Analysiert wurde hier mit Hilfe der Durchflusszytometrie die intrazelluläre Produktion der Zytokine Interleukin-17, Interferon- $\gamma$ , Interleukin-10 und Interleukin-4.

Exemplarische Dot Plots der Färbungen sind in Abbildung 4.4-4 aufgezeigt. Das morphologische Bild (forward side scatter) zeigte eine T-Zellpopulation mit aktivierten Zellen (siehe Feld R1). Die Quantifizierung der Zellen mit bestimmtem Zytokinprofil geht aus Tabelle 4.4-1 hervor.

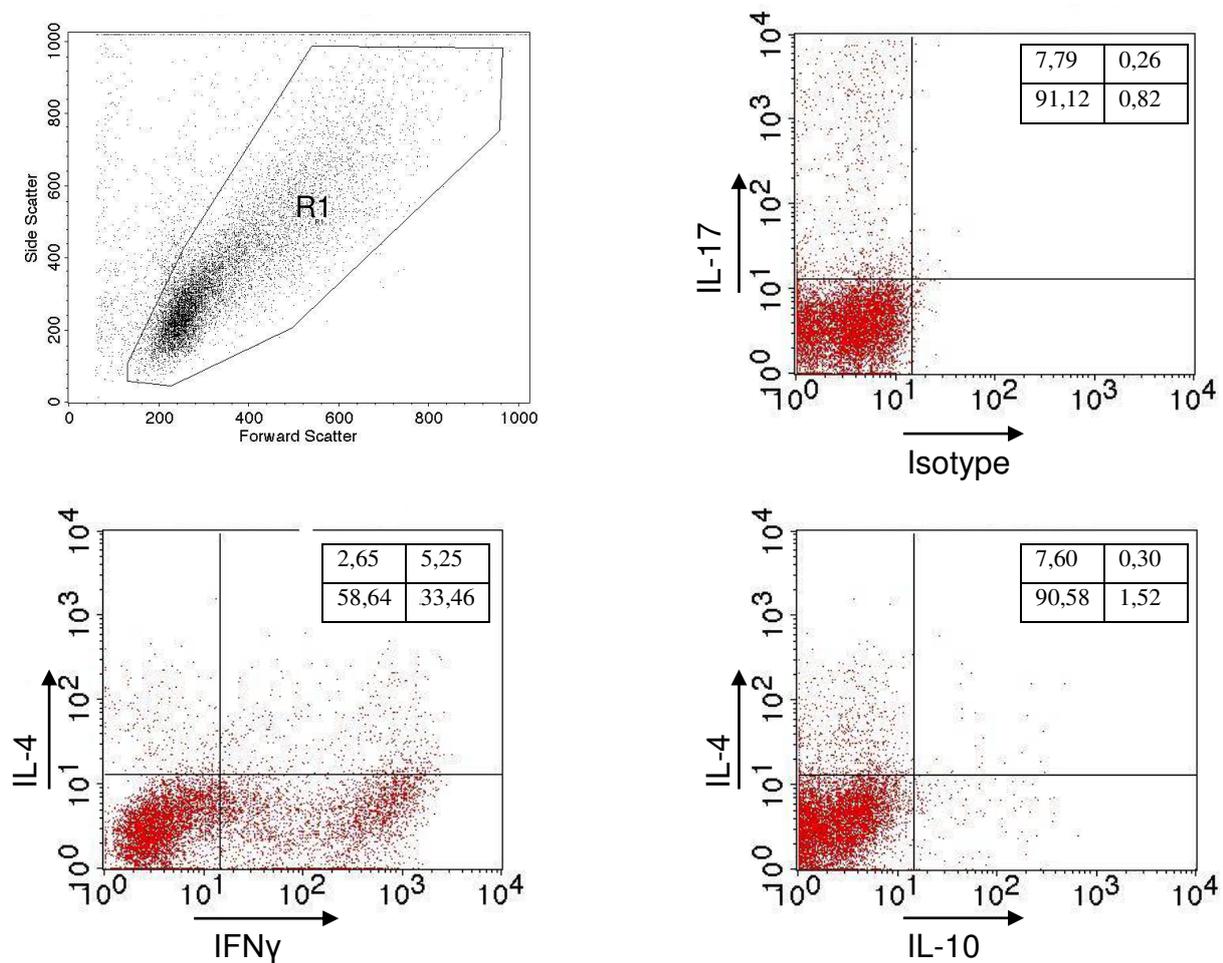


Abb. 4.4-4. Intrazytoplasmatische Zytokinfärbung in T-Gedächtniszellen. Gezeigt ist eine exemplarische Färbung nach 7 Tagen Koinkubation mit LPS vorstimulierten Dendritischen Zellen.

	IL-17	IFN- $\gamma$	IL-4
LPS	10.60%	37.77%	21.11%
Ethanol 10-10M	11.82%	38.68%	16.53%
E2 10-10M	10.15%	43.05%	16.97%
Prog. 10-9M	10.93%	38.25%	20.10%
Test. 10-10M	11.89%	37.33%	16.36%
Ethanol 10-5M	10.48%	35.53%	17.88%
E2 10-5M	11.99%	41.50%	21.52%
Prog. 10-5M	11.36%	45.72%	20.19%
Test. 10-5M	11.27%	38.46%	22.75%

	IL-17	IFN- $\gamma$	IL-4
Ethanol 10-10M	6.90%	30.29%	5.56%
Ethanol 10-9M	7.82%	34.21%	5.25%
E2 10-10M	6.80%	32.60%	6.65%
Prog. 10-9M	7.50%	30.30%	6.79%
Test. 10-10M	7.80%	34.38%	6.75%
Ethanol 10-5M	7.52%	32.24%	6.39%
E2 10-5M	9.47%	36.62%	6.06%
Prog. 10-5M	8.08%	37.54%	6.20%
Test. 10-5M	8.05%	36.87%	6.11%

*Tabelle 4.4-1. Intrazytoplasmatische Zytokinfärbung in T-Gedächtniszellen nach 7 Tagen Koinkubation mit 17 $\beta$ -Estradiol (E2), Progesteron (Prog.) und Testosteron (Test.) vorstimulierten Dendritischen Zellen. Gezeigt ist die Quantifizierung der Zellen mit bestimmtem Zytokinprofil in Prozent (zu vergleichen mit der jeweiligen Ethanolkontrolle) von 2 unabhängigen Experimenten.*

Es zeigte sich eine vermehrte Population von Interferon- $\gamma$  produzierenden T-Zellen (Th1-Zellen) nach Koinkubation mit Dendritischen Zellen, die mit physiologischen Konzentrationen von 17 $\beta$ -Estradiol vorstimuliert wurden. In einem zweiten Experiment konnte dieser Effekt jedoch nicht bestätigt werden. Bei Verwendung von pharmakologischen Konzentrationen zeigte sich tendenziell eine Polarisierung der T-Gedächtniszellen in Richtung Th1 durch alle drei Sexualhormone. Die Effekte auf die Interleukin-17 Produktion waren schwach ausgeprägt, allenfalls in hohen Hormonkonzentrationen ließ sich bei beiden Experimenten eine geringfügige Induktion der Th17-Polarisierung durch alle drei Sexualhormone beobachten. Die Quantifizierung der Interleukin-4 produzierenden Zellen ergab kein eindeutiges Bild.

Die Interleukin-10 Produktion war in diesem Zusammenhang vernachlässigbar und ist deshalb nicht in die Quantifizierung eingefügt.

#### 4.4.2 Indirekte Effekte von Sexualhormonen auf die Differenzierung von naiven T-Zellen

Der nächste Schritt bestand darin, die indirekte Wirkung von Sexualhormonen auf die T-Zell-Differenzierung zu untersuchen. Hierfür wurden die mit Sexualhormonen vorstimulierten Dendritischen Zellen in Kokultur-Experimente mit allogenen naiven T-Zellen eingebracht. Analog zum allogenen Lymphozytenstimulationstest mit T-Gedächtniszellen wurden die vorstimulierten Dendritischen Zellen zwei- bis dreimal mit DPBS w/o Ca/Mg gewaschen, sodass keine Hormone und keine durch die DZs im Voraus produzierten Zytokine im Ansatz waren. Dabei wurden in einer 96 well Flachbodenplatte zu 10.000 Dendritischen Zellen 200.000 naive T-Zellen pro well gegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen wurde wiederum die Proliferationsaktivität der naiven T-Zellen mit Hilfe des H3-Thymidin-Tests untersucht (siehe 3.2.5).

Hierbei zeigte sich eine deutliche Induktion der T-Zell-Proliferation nach Kokultur mit Dendritischen Zellen, die mit physiologischen Sexualhormonkonzentrationen vorstimuliert wurden. Ein ähnliches Bild zeigte sich nach Anwendung von pharmakologischen Hormonkonzentrationen. Dabei steigerte 17 $\beta$ -Estradiol die Proliferationsaktivität sowohl in physiologischen ( $p=0,0474$ ) als auch in pharmakologischen Konzentrationen ( $p=0,0105$ ) signifikant (siehe Abbildung 4.4-5).

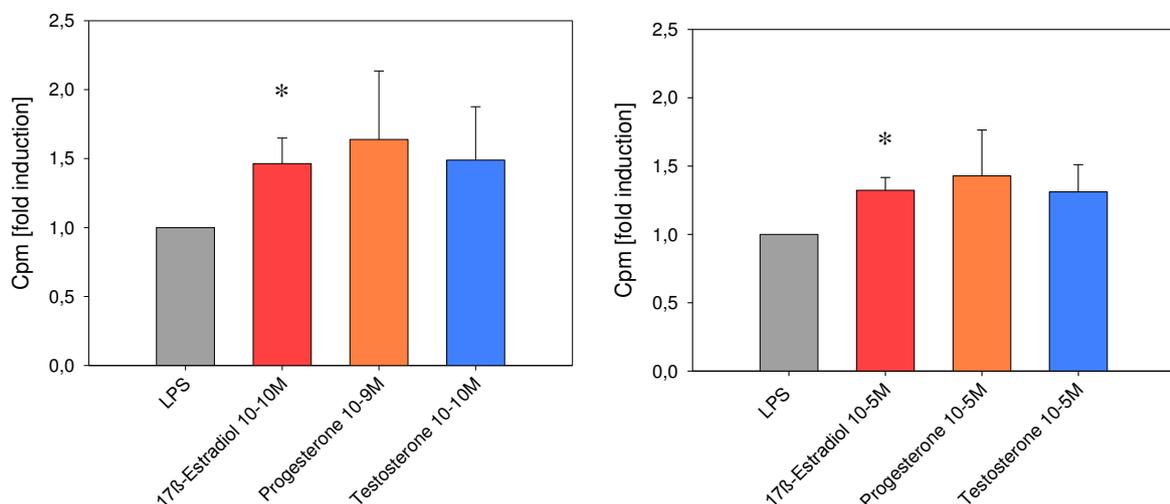


Abb. 4.4-5. Proliferationsaktivität von naiven T-Zellen nach 5 Tagen Koinkubation mit vorstimulierten DZs. Gezeigt ist die relative Induktion gegenüber der LPS/Ethanolkontrolle (gleich 1,0 gesetzt): 3756,69  $\pm$  568,16cpm (Kontrolle 10<sup>-10</sup>M), 3944,08  $\pm$  599,26cpm (Kontrolle 10<sup>-9</sup>M), 4232,31  $\pm$  648,98cpm (Kontrolle 10<sup>-5</sup>M), nach Stimulation der DZs mit physiologischen (linkes Bild) und pharmakologischen (rechtes Bild) Sexualhormonkonzentrationen. \* =  $p < 0,05$  gepaarter  $t$ -Test. Mittelwerte  $\pm$  SEM von 4 unabhängigen Experimenten.

Analog zum Vorgehen mit T-Gedächtniszellen wurde parallel vorsichtig zellfreier Überstand asserviert und auf Th17 (IL-17, IL-22), Th1 (IFN $\gamma$ ) und Th2 (IL-4) assoziierte Zytokine hin untersucht.

Interleukin-4 war in keinem der vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimente im zellfreien Überstand nachweisbar.

Auch Interleukin-17 lag in allen Experimenten unter der sicheren Nachweisgrenze im ELISA.

Die Interleukin-22 Produktion war in zwei der vier Experimente im Überstand nachweisbar und betrug nach Vorstimulation der DZs mit 100ng/ml LPS und der jeweiligen Ethanolkontrolle  $161,30 \pm 5,45$ pg/ml (Kontrolle  $10^{-10}$ M),  $172,01 \pm 16,16$ pg/ml (Kontrolle  $10^{-9}$ M) und  $179,14 \pm 18,94$ pg/ml (Kontrolle  $10^{-5}$ M).

Die Interferon- $\gamma$  Sekretion lag in drei von vier Experimenten über der Detektionsgrenze des ELISAs und erreichte niedrige Werte von  $200,86 \pm 65,79$ pg/ml (Kontrolle  $10^{-10}$ M),  $184,34 \pm 73,34$ pg/ml (Kontrolle  $10^{-9}$ M) und  $437,22 \pm 194,54$  pg/ml (Kontrolle  $10^{-5}$ M).

Interleukin-10 konnte in allen Experimenten in folgenden Konzentrationen gemessen werden:  $180,26 \pm 55,71$ pg/ml (Kontrolle  $10^{-10}$ M),  $167,80 \pm 48,11$ pg/ml (Kontrolle  $10^{-9}$ M) und  $144,34 \pm 48,94$ pg/ml (Kontrolle  $10^{-5}$ M).

Insgesamt zeigte sich keine signifikante Beeinflussung der Zytokinsekretion durch Sexualhormone.

Abbildung 4.4-6 zeigt eine Übersicht über die Ergebnisse.

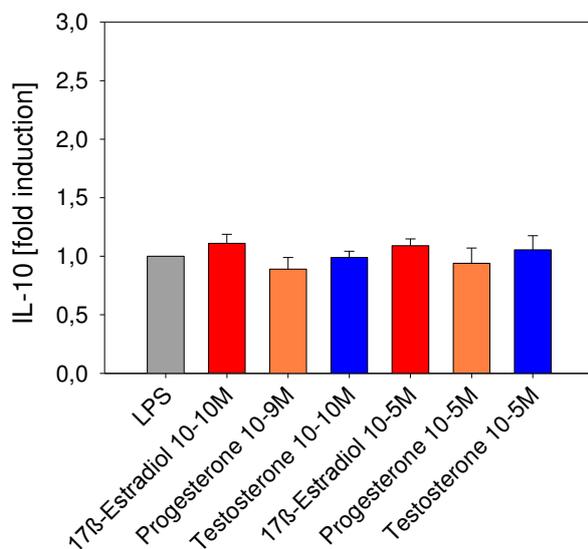
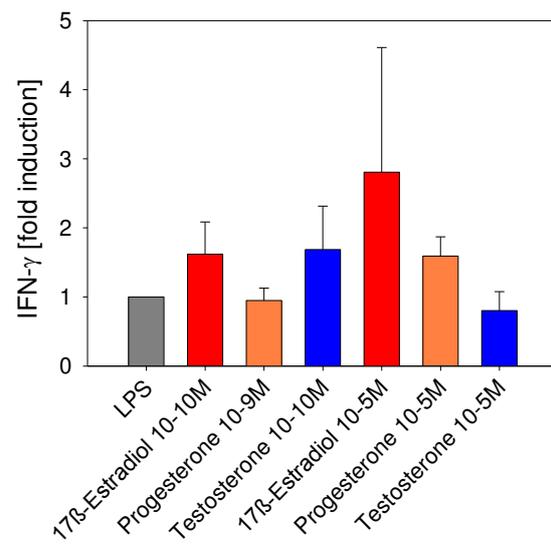
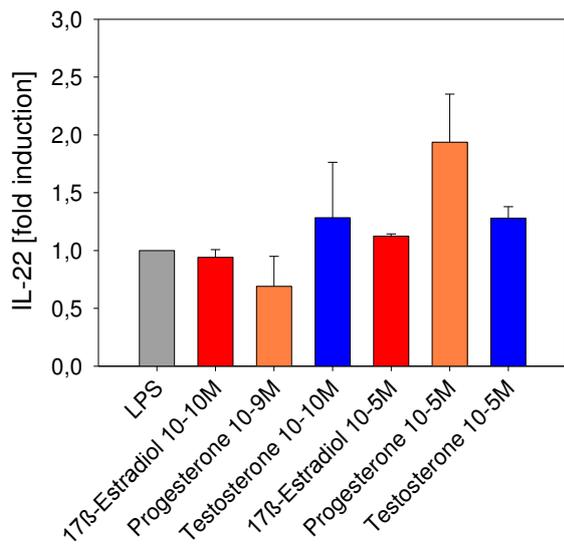


Abb. 4.4-6. Zytokinproduktion von naiven T-Zellen nach 5 Tagen Koinkubation mit vorstimulierten DZs.

Gezeigt ist die relative Induktion gegenüber der LPS/Ethanolkontrolle nach Stimulation der DZs mit physiologischen und pharmakologischen Sexualhormonkonzentrationen.

Interleukin-22: Mittelwerte  $\pm$  SEM von 2 unabhängigen Experimenten.

Interferon- $\gamma$ : Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 unabhängigen Experimenten.

Interleukin-10: Mittelwerte  $\pm$  SEM von 4 unabhängigen Experimenten.

Zusätzlich wurde wiederum auch das Zytokinprofil innerhalb der Zellen untersucht: Gemessen wurde hier an Tag 7 des allogenen Lymphozytenstimulationstests, mit Hilfe der Durchflusszytometrie, die intrazelluläre Produktion der Zytokine Interleukin-22, Interleukin-17, Interferon- $\gamma$ , Interleukin-10 und Interleukin-4.

Abbildung 4.4-7 zeigt eine exemplarische Färbung. Das morphologische Bild (forward side scatter) zeigte analog zu den Experimenten mit T-Gedächtniszellen eine T-Zellpopulation mit aktivierten Zellen (siehe Feld R1). Die Quantifizierung des Zytokinprofils geht aus Tabelle 4.4-2 hervor.

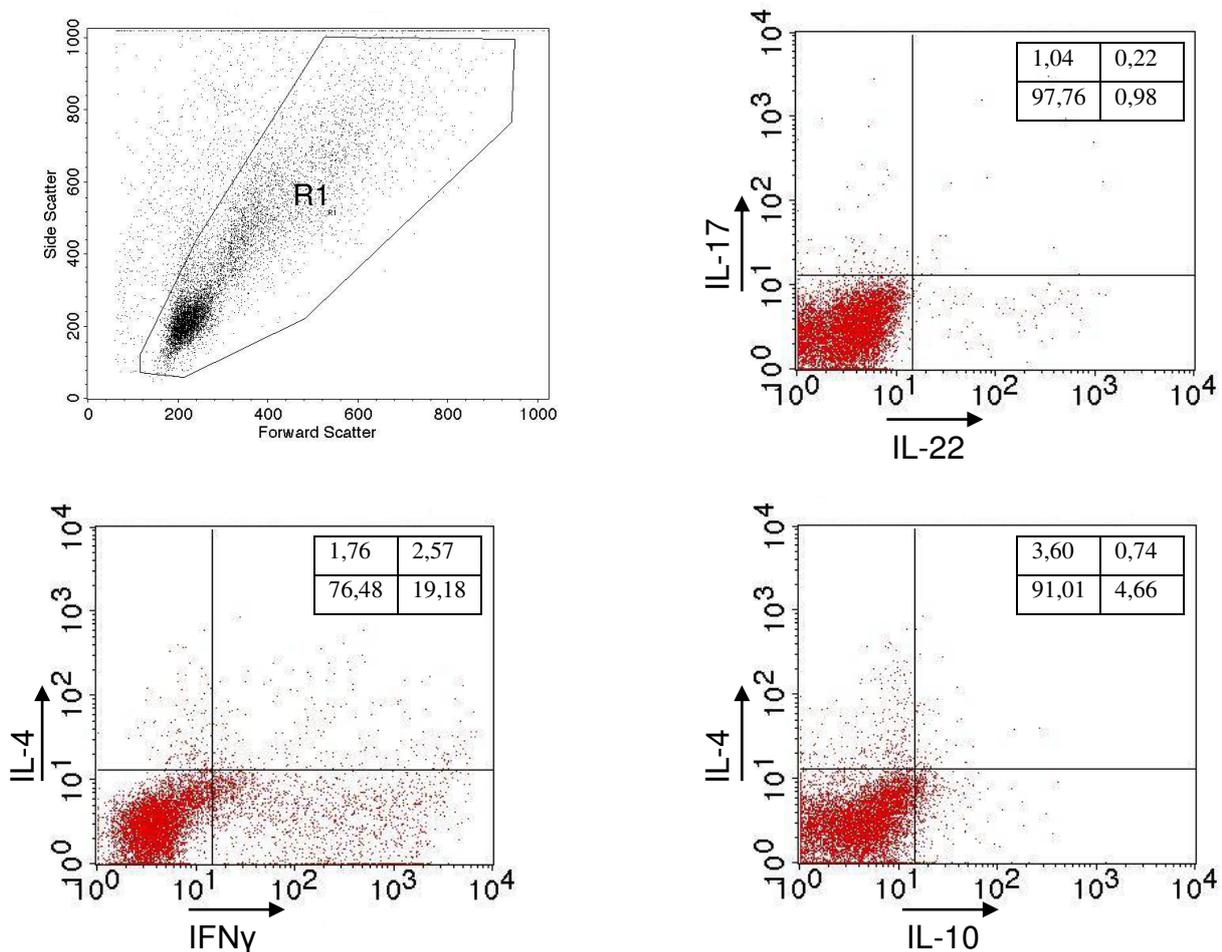


Abb. 4.4-7. Intrazytoplasmatische Zytokinfärbung in naiven T-Zellen. Gezeigt ist eine exemplarische Färbung nach 7 Tagen Koinkubation mit LPS vorstimulierten Dendritischen Zellen.

	IL-17	IL-22	IFN- $\gamma$	IL-4
LPS	3.74%	0.53%	8.50%	0.94%
E2 10-10M	0.76%	0.39%	6.83%	0.86%
Prog. 10-9M	0.82%	1.21%	14.54%	1.09%
Test. 10-10M	0.95%	0.42%	7.51%	1.25%

Ethanol 10-5M	0.54%	0.70%	19.58%	0.97%
E2 10-5M	0.90%	0.37%	13.17%	0.70%
Prog. 10-5M	1.21%	0.45%	14.13%	1.11%
Test. 10-5M	0.45%	0.74%	17.38%	1.02%

	IL-17	IL-22	IFN- $\gamma$	IL-4
LPS	0.75%	1.48%	18.58%	3.44%
E2 10-10M	1.09%	1.04%	18.63%	3.71%
Prog. 10-9M	1.13%	1.46%	20.97%	4.73%
Test. 10-10M	1.37%	1.49%	16.37%	4.34%

Ethanol 10-5M	0.77%	1.20%	16.27%	4.26%
E2 10-5M	0.92%	1.29%	15.63%	4.31%
Prog. 10-5M	0.89%	1.56%	18.74%	4.81%
Test. 10-5M	0.93%	1.45%	17.17%	4.45%

	IL-17	IL-22	IFN- $\gamma$	IL-4
Ethanol 10-10M	3.58%	2.43%	25.00%	10.83%
Ethanol 10-9M	3.59%	1.83%	22.42%	11.54%
E2 10-10M	3.13%	1.48%	19.19%	8.5%
Prog. 10-9M	2.45%	2.61%	16.66%	7.16%
Test. 10-10M	3.35%	2.27%	19.30%	8.76%

Ethanol 10-5M	3.21%	2.39%	19.39%	10.19%
E2 10-5M	4.76%	2.35%	18.65%	10.94%
Prog. 10-5M	3.08%	2.37%	13.38%	6.78%
Test. 10-5M	3.09%	2.27%	15.95%	7.74%

*Tabelle 4.4-2. Intrazytoplasmatische Zytokinfärbung in naiven T-Zellen nach 7 Tagen Koinkubation mit 17 $\beta$ -Estradiol (E2), Progesteron (Prog.) und Testosteron (Test.) vorstimulierten Dendritischen Zellen. Gezeigt ist die Quantifizierung der Zellen mit bestimmtem Zytokinprofil in Prozent (zu vergleichen mit der jeweiligen Ethanolkontrolle, wenn nicht vorhanden, mit LPS) von drei unabhängigen Experimenten.*

Insgesamt zeigte sich ein inhomogenes Bild ohne signifikante Effekte. Die IL-10 Produktion war in diesem Zusammenhang vernachlässigbar niedrig und ist deshalb nicht in die Quantifizierung eingefügt.

## 5. Diskussion

Epidemiologische Studien zeigen einen eindeutigen Zusammenhang zwischen Hormonstatus und Ausprägung atopischer Erkrankungen. So leiden vor der Pubertät mehr Jungen unter Asthma bronchiale und atopischem Ekzem, während unter Erwachsenen beim weiblichen Geschlecht sowohl eine höhere Inzidenz als auch ein höherer Schweregrad zu beobachten ist (Almqvist et al. 2008, Chen et al. 2008, Harrop et al. 2007, Jensen-Jarolim et al. 2008, Mohrenschlager et al. 2006).

Die molekularen Mechanismen dieser epidemiologischen Befunde sind dabei noch weitestgehend ungeklärt.

Ziel dieser Arbeit sollte es sein, den Einfluss der wichtigsten weiblichen Sexualhormone 17 $\beta$ -Estradiol, Progesteron und des männlichen Geschlechtshormons Testosteron auf die Achse zwischen Dendritischen Zellen und T-Zellen *in vitro* zu untersuchen.

### 5.1 Einfluss des hormonreduzierten Kultursystems

Gut etablierte Zellkulturmedien zur Generierung und Kultur von Dendritischen Zellen und T-Zellen basieren auf bovinem oder humanem Serum (Lehner et al. 2005). Beides Bestandteile, die zu einer hohen Hormonkontamination des Kultursystems führen.

Insbesondere die in dieser Studie untersuchten Geschlechtshormone 17 $\beta$ -Estradiol, Progesteron und Testosteron liegen in diesen Medien im Bereich von 10<sup>-9</sup>M und entsprechen den physiologisch messbaren Konzentrationen von Progesteron und Testosteron bei Frauen. Die Konzentration von 17 $\beta$ -Estradiol liegt bereits eine Zehnerpotenz über der physiologischen Konzentration bei nichtschwangeren Frauen, die im Bereich von 10<sup>-10</sup>M angesiedelt ist (Dörner et al. 2009, Stephens et al. 2006).

Genauere Untersuchungen zum Einfluss dieser Geschlechtshormone auf Dendritische Zellen (direkte Effekte) und der darauffolgenden Beeinflussung allogener T-Zellen (indirekte Effekte) erfordern somit die Etablierung eines Kultursystems, das möglichst geringe Hormonkontamination aufweist, um unspezifische Effekte gering zu halten. Idealerweise sollte dieses Medium ausserdem die Reifung und Funktion der Dendritischen Zellen und T-Zellen ermöglichen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass beide Bedingungen nicht vollständig erfüllt werden können.

Einfluss von serumfreiem Medium:

Dendritische Zellen, die in serumfreiem Medium auf Basis von humanem Serum Albumin generiert wurden, überlebten nur zu etwa 50% nach 6 Tagen in Kultur und nach Stimulation mit LPS in 6 unabhängigen Experimenten. Darüber hinaus waren diese Zellen nicht in der Lage, Interleukin-12 und Interleukin-23 in messbaren Mengen zu produzieren. Der Phänotyp zeigte zwar vor der Stimulation mit LPS das charakteristische Muster an Oberflächenmarkern, wie es bei unreifen MoDZs beobachtet wird (CD14-negativ, niedrige Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD80 und CD86) (Mellman et al. 2001), jedoch führte die Stimulation mit LPS nicht zu einer Hochregulierung von Reifungs- und Aktivierungsmarkern (CD1a, HLA-ABC, HLA-DR, CD80, CD83, CD86, CD40), die auf einem konstant niedrigen Level blieben.

Dendritische Zellen, die in serumfreiem Medium generiert wurden, also in einem Medium mit vernachlässigbaren Hormonkonzentrationen, zeigten somit eine hochgradige Beeinträchtigung in ihrer Funktion als professionelle Antigenpräsentierende Zellen.

Erwartungsgemäß waren diese Zellen im anschließenden allogenen Lymphozytenstimulationstest nicht in der Lage, T-Gedächtniszellen zu stimulieren. Für die hier durchgeführten Untersuchungen konnte dieses Medium somit nicht verwendet werden.

Die vorliegenden Ergebnisse liefern jedoch einen ersten indirekten Hinweis darauf, dass in Serum enthaltene Produkte insbesondere für die Reifung der Zellen von Bedeutung sind: In den Ergebnissen ist dies durch das Fehlen der Interleukin-12 und Interleukin-23 Produktion nach Kultur in serumfreiem Medium und der darauffolgenden Unfähigkeit, die Proliferation und Zytokinproduktion von allogenen T-Zellen zu stimulieren, widerspiegelt.

Die Möglichkeit Dendritische Zellen in serumfreiem Medien zu generieren, ist dennoch von großem Interesse: Insbesondere in klinischen Anwendungen wie bei der tumorspezifischen Immuntherapie (Schuler et al. 2010, Schuler et al. 2003) ist es erforderlich, dass Dendritische Zellen bei ihrer Generierung *in vitro* möglichst nicht mit xenogenen Antigenen in Berührung kommen, wie es bei der Verwendung von fetalem Kälber Serum oder humanem Serum der Fall ist. Auch die Verwendung von autologem Serum ist problematisch, da auch hier verschiedene Proteine, insbesondere Antikörper, vorkommen, die die Antigenaufnahme und Prozessierung der generierten Dendritischen Zellen beeinflussen können (Tarte et al. 2000).

In diesem Kontext wurden bereits mehrfach Versuche unternommen, serumfreie Kultursysteme für die Generierung von Dendritischen Zellen zu etablieren. So verwendeten Araki et al. ein Medium unter Verwendung von RPMI 1640 und Albumin zur Generierung von MoDZs. Diese waren CD1a-positiv und exprimierten in hohem Maße kostimulatorische

Moleküle (Araki et al. 2001). Aus dieser Studie geht jedoch nicht hervor, inwiefern diese Zellen in der Lage waren, Zytokine zu produzieren.

Im Gegensatz dazu führten Versuche mit serumfreiem AIMV Medium zu einer deutlichen Minderung der CD1a-Expression von MoDZs im Vergleich zu Zellen, die in serumhaltigem Medium kultiviert wurden. Des Weiteren zeigten diese Zellen deutlich niedrigere Interleukin-12 Produktion (Lehner et al. 2005).

In Experimenten mit serumfreiem X-Vivo15 Medium waren reife Dendritische Zellen nicht in der Lage, Interleukin-12 zu produzieren und zeigten niedrige Expression von HLA-DR, CD86 und CD83 (Napoletano et al. 2007).

Diese Daten lassen ebenfalls den indirekten Schluss zu, dass Dendritische Zellen zur optimalen Reifung gewisse Bestandteile von Serum benötigen.

Ein kommerziell erhältliches Medium ist das Serum-free Dendritic Cell Medium der Firma CellGro. Wie unser serumfreies Medium basiert es ebenfalls auf humanem Albumin, Transferrin und Insulin. Dendritische Zellen, die in CellGro Medium generiert wurden, produzierten Interleukin-12 und waren in der Lage, T-Zell-Proliferation in einer mixed lymphocyte reaction (MLR) zu induzieren (Napoletano et al. 2007). Zusammengenommen also eigentlich ein gutes Medium für die vorliegende Arbeit. Ein wesentliches Problem dieses Mediums ist jedoch, dass es nur mit dem pH-Indikator Phenolrot erhältlich ist, welches wiederum signifikante östrogenartige Wirkungen aufweist (Berthois et al. 1986). Darüber hinaus ist die genaue Zusammensetzung ein Firmengeheimnis, was erstens einen direkten Vergleich zu unserem serumfreien Medium erschwert und zweitens keinerlei Rückschlüsse auf die genaue Hormonkontamination zulässt.

Einfluss von hormonreduziertem Medium:

In serumfreiem Medium generierte Dendritische Zellen produzierten weder Interleukin-12 noch Interleukin-23 und waren nicht in der Lage, die Zytokinproduktion und Proliferation von T-Zellen in einem allogenen Lymphozytenstimulationstest zu stimulieren.

Um dieser Problematik zu entgehen, wurde im nächsten Schritt ein Medium, das Charcoal/Dextran vorbehandeltes fetales Kälberserum enthält, verwendet (Zaitso et al. 2007): Dieses Verfahren reduziert die Konzentration von Hormonen und verschiedenen Wachstumsfaktoren. So bewirkt es eine Reduktion der 17 $\beta$ -Estradiol-Konzentration von 10<sup>-9</sup>M auf eine Konzentration, die im vernachlässigbaren Bereich von 10<sup>-12</sup>M liegt. Auch die Testosteronkonzentration verringert sich um eine Zehnerpotenz von 10<sup>-9</sup>M auf Bereiche um 10<sup>-10</sup>M, während die Progesteronkonzentration konstant bei etwa 10<sup>-9</sup>M bleibt (Stephens et al. 2006). Wie auch das serumfreie Medium basiert das hormonreduzierte Medium auf IMDM ohne Phenolrot, um östrogenartige Wirkungen zu vermeiden (Berthois et al. 1986).

Nach Zugabe von 10% Charcoal/Dextran vorbehandeltem fetalem Kälberserum ergaben sich Hormonkonzentrationen im Zellmedium, die durchweg mindestens eine Zehnerpotenz unter den physiologischen Werten lagen (siehe Tabelle 5.1-1). Auffällig ist hierbei, dass vor allem die 17 $\beta$ -Estradiol-Konzentration gesenkt wird, ein Umstand, der in der weiteren Diskussion der vorliegenden Ergebnisse eine wichtige Rolle spielen wird.

	♀	Konventionelles Zellmedium (10% FBS)	Hormonreduziertes Medium 10% CDFBS (Hyclone)
17- $\beta$ -Estradiol	1,5-7,3x10 <sup>-10</sup> M (follikular) 3,7-5,5x10 <sup>-10</sup> M (luteal)	2,4x10 <sup>-10</sup> M	3,7x10 <sup>-13</sup> M
Testosteron	1,3 -2,6x10 <sup>-9</sup> M	1,5x10 <sup>-10</sup> M	1,0x10 <sup>-11</sup> M
Progesteron	3x10 <sup>-9</sup> M (follikular) 3,6x10 <sup>-9</sup> M (luteal)	3,0x10 <sup>-10</sup> M	3,0x10 <sup>-10</sup> M

*Tab. 5.1-1. Physiologische Hormonkonzentrationen bei prämenopausalen Frauen und Stoffmengenkonzentration von Sexualhormonen in konventionellem Zellmedium auf Basis von 10% bovinem Serum (FBS) sowie in hormonreduziertem Medium mit 10% Charcoal/Dextran vorbehandeltem fetalem Kälberserum (CDFBS) nach (Stephens et al. 2006).*

Nach 5-6 Tagen Kultur in hormonreduziertem Medium zeigte sich ein sehr gutes Überleben der Dendritischen Zellen: Während in serumfreiem Medium nur etwa die Hälfte der Zellen überlebten, betrug die Rate an nekrotischen Zellen in hormonreduziertem Medium nur etwa 10%. Diese Zellen waren außerdem, im Gegensatz zu den serumfrei kultivierten Zellen, in der Lage, die Zytokine Interleukin-12 und Interleukin-23 zu produzieren und T-Zellen in einem allogenen Lymphozytenstimulationstest zu stimulieren.

Abstriche mussten jedoch in Kauf genommen werden: Nachweislich produzieren Dendritische Zellen nach Stimulation mit LPS hohe Raten an Interleukin-12 (Reis e Sousa et al. 1997).

In der vorliegenden Studie konnte Interleukin-12 jedoch nur in der Hälfte der Experimente nachgewiesen werden und dies in vergleichsweise sehr niedrigen Konzentrationen von 28 bis zu 404pg/ml. Auch die Interleukin-23 Produktion lag in einigen Fällen nur knapp über der Nachweisgrenze des ELISAs. Die Expression der Reifungs- und Aktivierungsmarker (insbesondere CD1a, HLA DR, CD40, CD80) zeigte sich ebenfalls beeinträchtigt.

Es ist bekannt, dass das Fehlen von kostimulatorischen Signalen zu einer antigenspezifischen Unreaktivität (Anergie) von T-Zellen führt (Bretscher et al. 1999).

Insbesondere die korrekte Expression von CD40 ist in diesem Zusammenhang wichtig für die Initiierung einer adäquaten Immunantwort (Cella et al. 1996).

Die beeinträchtigte Zytokinproduktion und Expression von Reifungs- und Aktivierungsmarkern durch die Dendritischen Zellen könnte ein Grund für die beobachtete herabgesetzte Stimulation von T-Zellen im allogenen Lymphozytenstimulationstest sein:

In der vorliegenden Studie lag die Proliferation von T-Gedächtniszellen, nach Kokultivierung mit LPS vorstimulierten Dendritischen Zellen, in einem im Vorfeld durchgeführten Experiment mit serumhaltigem Medium im Bereich von 12000cpm. Im Vergleich dazu ergaben sich bei Verwendung von hormonreduziertem Medium deutlich niedrigere Proliferationswerte um 2600cpm. Es zeigten sich zudem starke interindividuelle Schwankungen.

Eine herabgesetzte Stimulation der T-Zellen durch Dendritische Zellen nach Kultur in hormonreduziertem Medium spiegelte sich auch in deren Zytokinproduktion wider: Insbesondere die ELISA-Daten der Zytokine Interferon- $\gamma$ , Interleukin-17 und Interleukin-22 zeigten erhebliche Schwankungen sowohl zwischen den Experimenten als auch in den Replikaten innerhalb der Experimente, ein Hinweis auf suboptimale und inkonstante Stimulation der T-Zellen durch die Dendritischen Zellen.

Des Weiteren fällt im Vergleich zu einem Versuch mit serumhaltigem Medium die herabgesetzte Menge der produzierten Zytokine auf: So betrug die Interferon- $\gamma$  Produktion von T-Gedächtniszellen nach Kokultur mit LPS vorstimulierten Dendritischen Zellen in serumhaltigem Medium 128000pg/ml, die Interleukin-17 Produktion 538pg/ml. In hormonreduziertem Medium betrug die Interferon- $\gamma$  Produktion lediglich im Schnitt 250pg/ml, die Interleukin-17 Produktion 60pg/ml.

Wie oben bereits erwähnt, ist in Charcoal/Dextran vorbehandeltem fetalem Kälberserum vor allem die Konzentration von 17 $\beta$ -Estradiol gesenkt.

Eine mögliche Erklärung für die beschriebenen Defizite in Reifung und Funktion der Dendritischen Zellen in hormonreduziertem Medium im Vergleich zu serumhaltigem Medium könnte somit in der herabgesetzten 17 $\beta$ -Estradiol-Konzentration im verwendeten Kultursystem liegen.

Dies lässt sich in Einklang mit einer Studie von Paharkova-Vatchkova et al. bringen, die zeigen konnte, dass myeloide Dendritische Zellen in einem steroidreduzierten Medium schlechter reiften als in serumhaltigem Medium. Darüber hinaus konnte die Funktion dieser Zellen durch Zugabe von physiologischen 17 $\beta$ -Estradiol-Konzentrationen wiederhergestellt werden. Testosteron zeigte in diesem Zusammenhang keine Effekte (Paharkova-Vatchkova et al. 2004).

Ein diesbezüglich durchgeführtes Pilotexperiment konnte diese Daten auf MoDZs ausweiten: Dendritische Zellen, die in hormonreduziertem Medium mit zusätzlich 17 $\beta$ -Estradiol in hohen

Konzentrationen ( $10^{-5}\text{M}$ ) generiert wurden, zeigten eine etwa sechsfach erhöhte Interleukin-12 Produktion im Vergleich zu Kontrollzellen (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich dazu konnten Komi et al. zeigen, dass humane Monozyten-abgeleitete Dendritische Zellen nach Zugabe der Antiöstrogene Toremifen und Tamoxifen Defizite in der Fähigkeit aufwiesen, die Proliferation von allogenen T-Zellen zu induzieren sowie Interleukin-12 zu produzieren (Komi et al. 2000).

Insgesamt scheint also insbesondere  $17\beta$ -Estradiol eine Rolle in der korrekten Differenzierung und Funktion von Dendritischen Zellen zu spielen.

## 5.2 Direkte Effekte von Sexualhormonen auf Dendritische Zellen

Im vorangehenden Teil der Diskussion wurde deutlich, dass Dendritische Zellen zur korrekten Reifung und Funktion Hormone, insbesondere  $17\beta$ -Estradiol, zu benötigen scheinen. Nun soll der potentielle direkte Effekt von Sexualhormonen auf die Achse zwischen Dendritischen Zellen und T-Zellen besprochen werden.

Zunächst wurden direkte Effekte auf Dendritische Zellen betrachtet. Monozyten-abgeleitete Dendritische Zellen (MoDZs) wurden an Tag 5 oder 6 geerntet und anschließend mit einer physiologischen und einer pharmakologischen Konzentration der Hormone  $17\beta$ -Estradiol, Progesteron und Testosteron stimuliert. Da Dendritische Zellen starke oder simultane Signale brauchen, um zu reifen (siehe 1.3.1), wurde zusätzlich LPS zugegeben (entspricht Signal 3). Hierbei wurden sowohl mögliche Effekte auf die Expression der Reifungs- und Aktivierungsmarker als auch auf die Zytokinproduktion der Zellen beleuchtet.

Nach Stimulation mit hohen pharmakologischen Sexualhormonkonzentrationen zeigten sich keine signifikanten Effekte auf die Expression der Reifungsmarker CD1a, HLA-ABC, HLA-DR und der Aktivierungsmarker CD80, CD83, CD86, CD40.

Dies steht im Einklang mit einer vergleichbaren Studie von Bengtsson et al., die ebenfalls keine Effekte von  $17\beta$ -Estradiol auf die Expression dieser Marker auf Monozyten-abgeleiteten Dendritischen Zellen beobachten konnte (Bengtsson et al. 2004). Im Gegensatz zu der vorliegenden Studie wurde jedoch konventionelles Medium auf Basis von RPMI und bovinem Serum verwendet, welches Effekte von  $17\beta$ -Estradiol verschleiern könnte.

Die Produktion von Interleukin-12 nach Stimulation der MoDZs mit physiologischen  $17\beta$ -Estradiol-Konzentrationen ( $10^{-10}\text{M}$ ) und LPS war im Vergleich zur Kontrolle um etwa 16 Prozent gesteigert, während sich nach Testosterongabe ( $10^{-10}\text{M}$ ) eine Hemmung um etwa 19 Prozent zeigte. Progesteron beeinflusste die IL-12 Sekretion kaum.

Ein ähnliches Bild zeigte sich auch nach Stimulation mit pharmakologischen Konzentrationen ( $10^{-5}\text{M}$ ), wobei sich die Induktion nach Stimulation mit  $17\beta$ -Estradiol (etwa 68 Prozent im Vergleich zur Kontrolle) noch deutlicher zeigte. Testosteron und Progesteron zeigten vernachlässigbare Effekte.

Interleukin-12 ist das Schlüsselzytokin für die Induktion einer Th1-Antwort (Akdis et al. 2011). Somit kann vermutet werden, dass  $17\beta$ -Estradiol durch die Stimulation der IL-12 Produktion in MoDZs sowohl in physiologischen als auch in pharmakologischen Konzentrationen eine Th1-Antwort fördert. Dies passt zu der oben besprochenen Beobachtung, dass vor allem  $17\beta$ -Estradiol für die korrekte Differenzierung und Funktion (charakterisiert durch die Produktion von IL-12) von MoDZs verantwortlich zu sein scheint.

Zusätzlich zeigen einige Studien im Maussystem eine Induktion von IL-12 und damit eine Begünstigung der Th1-Antwort durch  $17\beta$ -Estradiol (Siracusa et al. 2008, Wilcoxon et al. 2000).

Interessanterweise wird die Chronifizierung des atopischen Ekzems und Asthma bronchiale vor allem durch Th1-Zellen bestimmt (Bieber et al. 2008, Rebane et al. 2012, Trautmann et al. 2002).

Beides sind Erkrankungen, die bei Frauen häufiger vorkommen als bei Männern (Chen et al. 2008, Harrop et al. 2007, Jensen-Jarolim et al. 2008).

In der Zusammenschau kann somit vermutet werden, dass  $17\beta$ -Estradiol als wichtiges weibliches Sexualhormon durch die Begünstigung einer Th1-Antwort mitverantwortlich für die Chronifizierung von atopischem Ekzem und Asthma bronchiale sein könnte. Zusammen mit der eher hemmenden Wirkung des männlichen Geschlechtshormons Testosteron auf die IL-12 Produktion von MoDZs könnte dies den Geschlechtsunterschied in der Prävalenz dieser Erkrankungen teilweise erklären.

Die Produktion der Th17-assoziierten Zytokine Interleukin-6 und Interleukin-23 durch MoDZs wurde durch physiologische Sexualhormonkonzentrationen kaum beeinflusst.

Stimulationen mit etwas höheren Konzentrationen von  $17\beta$ -Estradiol ( $10^{-6}\text{M}$ ,  $10^{-8}\text{M}$ ) hatten ebenfalls keine Effekte auf die IL6 und IL23 Sekretion von MoDZs (Daten nicht gezeigt).

Eine Stimulation mit hohen pharmakologischen Konzentrationen ( $10^{-5}\text{M}$ ) führte jedoch zu einer signifikanten Steigerung der IL-6 Sekretion um etwa 17 Prozent nach Zugabe von Testosteron und um etwa 20 Prozent nach  $17\beta$ -Estradiolgabe. Progesteron zeigte wiederum kaum Effekte.

Die Interleukin-23 Produktion wurde durch Stimulation mit hohen Konzentrationen von  $10^{-5}\text{M}$   $17\beta$ -Estradiol um 23 Prozent im Vergleich zur Kontrolle gesteigert. Die Zugabe von  $10^{-5}\text{M}$  Progesteron bewirkte eine Steigerung um etwa 25 Prozent. Nach Stimulation mit  $10^{-5}\text{M}$  Testosteron ergab sich eine Induktion um etwa 56 Prozent.

Die Produktion der Th17-assoziierten Zytokine in MoDZs wurde somit vor allem durch hohe Konzentrationen von Sexualhormonen gesteigert.

Im Vergleich zu Th1-assoziierten Zytokinen, die schon bei physiologischen Konzentrationen spezifisch durch das weibliche Sexualhormon 17 $\beta$ -Estradiol induziert wurden, scheinen Th17-assoziierte Zytokine erst durch höhere Hormonkonzentrationen sowie durch männliche und weibliche Sexualhormone gleichermaßen beeinflussbar.

Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Bengtsson et al., die ebenfalls eine Induktion der IL-6 Sekretion von MoDZs nach Verwendung von hohen Konzentrationen von 17 $\beta$ -Estradiol beobachten konnten (Bengtsson et al. 2004). Da in dieser Studie RPMI Medium auf Serumbasis verwendet , ist zudem von einer zusätzlichen hohen Hormonkontamination auszugehen, die diesen Effekt verstärkt haben könnte. Die vorliegende Arbeit zeigt nun zum ersten Mal, dass sowohl männliche als auch weibliche Sexualhormone Th17-assoziierte Zytokine induzieren können.

Eine exzessive Th17-Antwort wird bei schweren therapieresistenten Formen des Asthma bronchiale beobachtet (Chakir et al. 2003, McKinley et al. 2008). Auch in der Pathogenese des atopischen Ekzems kommt Th17-Zellen eine wesentliche aggravierende Rolle zu (Cavani et al. 2012, Eyerich et al. 2009) (siehe auch 1.2).

Interessanterweise wurde in epidemiologischen Studien eine prämenstruelle Verschlechterung von Asthma bronchiale und atopischem Ekzem beobachtet (Kiryama et al. 2003, Murray et al. 1999). Zusätzlich zeigten Frauen, die synthetische Hormone im Zuge einer Kontrazeption oder Hormonersatztherapie einnahmen, eine höhere Prävalenz von Asthma (Gomez Real et al. 2006, Macsali et al. 2009).

Es könnte vermutet werden, dass sich Sexualhormone durch die Begünstigung einer Th17 Antwort negativ auf den Verlauf dieser Erkrankungen auswirken.

Relevante Effekte zeigten sich in der vorliegenden Studie jedoch nur bei Verwendung von hohen Konzentrationen ( $10^{-5}$ M). Die maximale Serumkonzentration von Progesteron (etwa  $10^{-6}$ M) und 17 $\beta$ -Estradiol (etwa  $10^{-7}$ M) bei Frauen wird in der Schwangerschaft erreicht (Belfort et al. 1996, Belfort MA et al. 1996) und ist somit deutlich niedriger als die in dieser Studie verwendete. Testosteron überschreitet in der Regel nicht Konzentrationen von etwa  $10^{-9}$ M (Dörner et al. 2009).

Ob die Induktion von Th17-assoziierten Zytokinen durch Sexualhormone auch *in vivo* relevant ist, bleibt angesichts dessen fraglich.

### 5.3 Allogener Lymphozytenstimulationstest

Im vorigen Kapitel wurden direkte Effekte von Sexualhormonen auf MoDZs besprochen. Im nächsten Schritt wurde die Relevanz dieser Beobachtungen für die Induktion einer bestimmten T-Zellantwort in T-Gedächtniszellen und naiven T-Zellen untersucht.

Hierzu wurden die mit Sexualhormonen stimulierten Dendritischen Zellen in Kokultur mit allogenen, von weiblichen Spendern isolierten naiven T-Zellen und T-Gedächtniszellen gebracht. Die Analyse der Proliferationsaktivität und des Zytokinmusters sollte mögliche indirekte Effekte durch Sexualhormone auf T-Zellen beleuchten.

#### Allogener Lymphozytenstimulationstest mit T-Gedächtniszellen

Zunächst wurden indirekte Effekte auf T-Gedächtniszellen untersucht, also Effekte auf T-Helferzellen, die bereits Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen hatten.

T-Zellen, die in Kokultur mit MoDZs gebracht wurden, die mit physiologischen  $17\beta$ -Estradiol-Konzentrationen vorstimuliert waren, zeigten dabei eine 15 prozentige Steigerung ihrer Proliferationsaktivität gegenüber der Kontrollkultur mit unstimulierten MoDZs. Nach Vorstimulation der MoDZs mit physiologischen Testosteron-Konzentrationen ergab sich eine um 24 Prozent gesteigerte Aktivität der kokultivierten T-Zellen. Progesteron zeigte in diesem Zusammenhang keinen Effekt.

Die Vorstimulation der MoDZs mit pharmakologischen Hormonkonzentrationen ergab eine Steigerung der Proliferationsaktivität allogener T-Zellen um signifikante 41 Prozent ( $17\beta$ -Estradiol), 24 Prozent (Testosteron) bzw. 27 Prozent (Progesteron).

Die Proliferationsaktivität dient als allgemeines Maß für die Teilungsaktivität der T-Zellen, unabhängig von der Richtung der spezifischen T-Zellantwort. Diese scheint durch  $17\beta$ -Estradiol vorstimulierte MoDZs am stärksten beeinflusst zu werden. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass  $17\beta$ -Estradiol die Gesamtheit der durch MoDZs produzierten Zytokine (IL-6, IL-12, IL-23) am stärksten induzierte.

Passend dazu konnten Bengtsson et al. in serumhaltigem Medium zeigen, dass mit hohen  $17\beta$ -Estradiol-Konzentrationen ( $20\mu\text{g/ml}$ ) vorstimulierte MoDZs, die Proliferationsaktivität von CD4-positiven T-Gedächtniszellen in einer mixed lymphocyte reaction im Vergleich zur Kontrolle steigerten (Bengtsson et al. 2004).

Komi et al. konnten zeigen, dass MoDZs nach Zugabe von Antiöstrogenen die Proliferationsaktivität von allogenen PBMCs weniger stimulierten als Kontroll-MoDZs (Komi et al. 2000).

Zusammenfassend liefert dies einen Hinweis darauf, dass  $17\beta$ -Estradiol auch für die Stimulation allogener T-Zellen relevant ist.

Die gesteigerte Auslösung der T-Zell-Proliferation durch Sexualhormone könnte, abhängig davon welcher T-Zell Subtyp vorrangig induziert wird, verschiedene Auswirkungen haben:

Die Induktion von regulatorischen T-Zellen (CD4+CD25+Treg-Zellen) würde die Immunantwort hemmen (Akdis et al. 2009). Sexualhormone hätten in diesem Fall in der Pathogenese von atopischen Erkrankungen eine protektive Wirkung.

Eine verstärkte Proliferation von Th2-Zellen fördert dagegen die Entstehung von allergischen Reaktionen vom Soforttyp (Bieber et al. 2008, Fanta et al. 2009). Sexualhormone würden die Entstehung von atopischen Erkrankungen begünstigen.

Die Induktion von Th17-Zellen hat fast ausschließlich proinflammatorische Effekte im atopischen Ekzem und Asthma bronchiale (Cavani et al. 2012, Eyerich et al. 2009, Nembrini et al. 2009, Souwer et al. 2010, Zhao et al. 2010) (siehe 1.2). Th1-Zellen spielen eine wichtige Rolle in deren Chronifizierung (Burger et al. 2002, Rowley et al. 2012, Zhao et al. 2010). Sexualhormone würden in diesen Fällen eine aggravierende Rolle bei atopischen Erkrankungen spielen.

Um die gesteigerte Proliferationsaktivität auf die Richtung der resultierenden T-Zell-Antwort zu spezifizieren, wurde die Zytokinproduktion der T-Zellen sowohl extrazellulär mittels ELISA als auch intrazellulär mittels intrazytoplasmatischer FACS-Färbung analysiert.

Die ELISA-Daten zeigten starke Schwankungen sowohl in den Replikaten als auch zwischen den verschiedenen Experimenten (siehe auch 5.1) und waren deshalb wenig aussagekräftig. Das Augenmerk galt somit der spezifischeren intrazytoplasmatischen Färbung.

Dabei zeigte sich in initialen Experimenten eine Polarisation von Th1-Zellen (Schlüsselzytokin IFN- $\gamma$ ) nach Koinkubation mit Dendritischen Zellen, die mit physiologischen Konzentrationen von 17 $\beta$ -Estradiol vorstimuliert wurden. Nachfolgende Experimente konnten diese spezifische Stimulation jedoch nicht bestätigen. Bei Verwendung von pharmakologischen Konzentrationen konnte konstant eine geringfügige Induktion von Th1-Gedächtniszellen durch alle drei Sexualhormone beobachtet werden.

17 $\beta$ -Estradiol steigerte als einziges Hormon die IL-12 Produktion von MoDZs.

Das zu erwartende Korrelat der spezifischen Polarisation von IFN- $\gamma$  produzierenden Th1-Zellen durch 17 $\beta$ -Estradiol vorstimulierte MoDZs konnte nicht beobachtet werden.

Anzumerken ist jedoch, dass nur zwei Experimente durchgeführt wurden.

Die Effekte auf die Interleukin-17 Produktion waren schwach ausgeprägt, allenfalls in hohen Hormonkonzentrationen ließ sich bei beiden Experimenten eine geringfügige Induktion der Th17-Polarisierung durch alle drei Sexualhormone beobachten. Dies entspricht der Beobachtung, dass pharmakologische Hormonkonzentrationen von männlichen und weiblichen Geschlechtshormonen gleichermaßen die Produktion der Th17-assoziierten Zytokine IL-23 und IL-6 in MoDZs stimulierten.

Th1- und Th17-Zellen spielen eine aggravierende Rolle in der Pathogenese atopischer Erkrankungen (siehe 1.2). Sexualhormone könnten durch die Induktion einer Th1- und Th17-Antwort krankheitsfördernd wirken. Die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Inzidenz und dem Schweregrad atopischer Erkrankungen spiegeln sich allerdings nicht in den Ergebnissen wider, da eine unspezifische Induktion durch männliche und weibliche Sexualhormone beobachtet werden konnte. Weitere Experimente sind notwendig, um die sehr schwachen Effekte zu bestätigen.

## Allogener Lymphozytenstimulationstest mit naiven T-Zellen

Im nächsten Schritt wurden Effekte von mit Sexualhormonen vorstimulierten MoDZs auf die Differenzierung von allogenen naiven T-Zellen untersucht.

MoDZs, die mit physiologischen  $17\beta$ -Estradiol-Konzentrationen vorstimuliert waren, steigerten dabei die Proliferationsaktivität der kokultivierten T-Zellen signifikant um etwa 46 Prozent.

Auch Testosteron (Steigerung um 49 Prozent) und Progesteron (Steigerung um 64 Prozent) wirkten induzierend auf die Proliferation. Ein Signifikanzniveau wurde aufgrund der ausgeprägten Schwankungen der Messwerte jedoch nicht erreicht.

Auch bei Verwendung von pharmakologischen Konzentrationen zeigte sich eine signifikante Steigerung der Proliferationsaktivität naiver T-Zellen durch  $17\beta$ -Estradiol vorstimulierte MoDZs (Induktion um 32 Prozent). Gleichmaßen, jedoch wiederum nicht signifikant, induzierten Progesteron vorstimulierte MoDZs um 43 Prozent und Testosteron vorstimulierte MoDZs um 31 Prozent die Proliferation der kokultivierten T-Zellen im Vergleich zu unstimulierten MoDZs.

Dies bestätigt wiederum das weibliche Sexualhormon  $17\beta$ -Estradiol als wichtigen Einflussfaktor auf die Achse zwischen Dendritischen Zellen und naiven T-Zellen.

Die signifikante Steigerung der Proliferationsaktivität allogener naiver T-Zellen bereits durch physiologische  $17\beta$ -Estradiol-Konzentrationen unterstreicht dabei die Relevanz dieses Hormons und passt zu der Beobachtung, dass  $17\beta$ -Estradiol bereits in physiologischen Konzentrationen die Interleukin-12 Produktion Dendritischer Zellen steigerte.

Auch mit Progesteron und Testosteron vorstimulierte MoDZs steigerten bereits nach Verwendung von physiologischen Konzentrationen die Proliferationsaktivität allogener naiver T-Zellen. Diese Effekte waren jedoch nicht signifikant. Dies findet kein passendes Korrelat in der Zytokinanalyse der stimulierten MoDZs, in der Progesteron keinen Effekt und Testosteron auf die IL-12 Produktion sogar einen eher hemmenden Effekt zeigte. Weitere Experimente sind notwendig, um diese Diskrepanz aufzulösen. Bis dahin bleibt  $17\beta$ -Estradiol jedoch das einzige Hormon, welches statistisch signifikant die Proliferation von naiven T-Zellen beeinflusste.

Diese Beobachtung lässt sich auch mit einer Studie von Douin-Echinard et al. (Douin-Echinard et al. 2008) vereinbaren. Diese konnte zeigen, dass Dendritische Zellen von Mäusen, die den Östrogen Rezeptor  $\alpha$  nicht exprimierten, die Proliferation naiver T-Zellen weniger stark induzierten als Kontrollzellen.

Um Auskunft über die Richtung der resultierenden Immunantwort zu erhalten, wurde das Zytokinprofil der naiven T-Zellen nach Kokultur mit den vorstimulierten MoDZs analysiert.

Auffallend bei der Betrachtung der ELISA-Daten war hierbei die sehr geringe bis fehlende Produktion T-Zell-relevanter Zytokine: So konnte das Th17-assoziierte Zytokin IL-17 in keinem Experiment nachgewiesen werden. Auch IL-22 (Th17-assoziiert) lag nur in der Hälfte der Experimente über der Detektionsgrenze des ELISAs. IFN- $\gamma$  (Th1) zeigte in drei von vier Experimenten nachweisbare Konzentrationen von höchstens 437pg/ml.

Dies passt zu der niedrigen Zytokinproduktion und Expression von Reifungs- und Aktivierungsmarkern der kokultivierten MoDZs, die somit wohl in ihrer Funktion, eine adäquate Differenzierung allogener naiver T-Zellen zu induzieren, gestört waren. Wie bereits oben besprochen, wurden alle Experimente in hormonreduziertem Medium durchgeführt, einem Medium, das vor allem die Konzentration von 17 $\beta$ -Estradiol herabsetzt. Die gestörte Differenzierung von naiven T-Zellen könnte somit auf den Mangel von 17 $\beta$ -Estradiol im Kultursystem zurückgehen.

Die intrazytoplasmatische Färbung zeigte vermutlich auch aus diesem Grund keine reproduzierbaren Effekte.

Inwiefern die gestörte Differenzierung der naiven T-Zellen auf die herabgesetzte Funktion der MoDZs nach Kultur in hormonreduziertem Medium zurückzuführen ist, oder ob die Reifung der T-Zellen direkt durch dieses Medium gestört wurde, müssen weitere Experimente zeigen.

Ein möglicher Ansatz wäre die gezielte Zugabe von 17 $\beta$ -Estradiol in eine T-Zellkultur.

## 6. Zusammenfassung

Atopische Erkrankungen wie Asthma bronchiale und atopisches Ekzem zeigen weltweit eine Zunahme ihrer Prävalenz und weisen einen hohen sozioökonomischen Stellenwert auf.

Die Pathogenese dieser Erkrankungen basiert dabei auf einem komplexen Zusammenspiel aus genetischer Prädisposition, Umweltfaktoren und dem Sozialverhalten.

Epidemiologische Studien konnten in diesem Kontext einen eindeutigen Zusammenhang zwischen Hormonstatus und Ausprägung atopischer Erkrankungen nachweisen: So leiden vor der Pubertät mehr Jungen unter Asthma bronchiale und atopischem Ekzem, während unter Erwachsenen beim weiblichen Geschlecht sowohl eine höhere Inzidenz als auch ein höherer Schweregrad zu beobachten ist.

Eine direkte Beeinflussung von Immunzellen durch Sexualhormone wird durch mehrere Studien bekräftigt, die genauen molekularen Mechanismen sind jedoch weitestgehend ungeklärt.

Diese Arbeit untersuchte den Einfluss der wichtigsten weiblichen Sexualhormone 17 $\beta$ -Estradiol und Progesteron und des männlichen Geschlechtshormons Testosteron auf die Achse zwischen Monozyten-abgeleiteten Dendritischen Zellen (MoDZs) und allogenen T-Zellen von weiblichen, nichtatopischen Spendern *in vitro*.

Um unspezifische Effekte durch Hormone im Kulturmedium zu minimieren, wurde ein hormonreduziertes Kultursystem auf Basis von Charcoal/Dextran vorbehandeltem fetalem Kälberserum etabliert: Dabei zeigten sich die Reifung und Funktion der DZs (widergespiegelt durch die herabgesetzte Zytokinproduktion, die niedrige Expression von Reifungs- und Aktivierungsmarkern und die darauf folgenden Defizite in der Induktion einer T-Zellantwort) im Vergleich zu serumhaltigem Medium herabgesetzt. In hormonreduziertem Medium ist vor allem die 17 $\beta$ -Estradiol-Konzentration erniedrigt. Dies lieferte einen ersten indirekten Hinweis auf die Relevanz dieses Hormons für die korrekte Reifung und Funktion der DZs.

Die Expression von Reifungs- und Aktivierungsmarkern auf MoDZs ließ sich durch Stimulation mit Sexualhormonen nicht beeinflussen.

Die Produktion des Th1-assoziierten Zytokins IL-12 wurde sowohl in physiologischen ( $10^{-10}$ M) als auch in pharmakologischen ( $10^{-5}$ M) Konzentrationen selektiv durch 17 $\beta$ -Estradiol gesteigert. Die Th17-assoziierten Zytokine IL-6 und IL-23 wurden durch pharmakologische Konzentrationen von 17 $\beta$ -Estradiol und Testosteron induziert. Progesteron steigerte in hohen Konzentrationen die IL-23 Produktion.

Der direkte Einfluss von Sexualhormonen auf die Zytokinsekretion von MoDZs zeigte sich auch für die Polarisierung von T-Gedächtniszellen und naiven T-Zellen relevant. 17 $\beta$ -Estradiol induzierte die Proliferationsaktivität der T-Zellen hierbei signifikant.

In der Zusammenschau kann vermutet werden, dass 17 $\beta$ -Estradiol, als wichtiges weibliches Sexualhormon, durch die Begünstigung einer Th1-Antwort mitverantwortlich für die Chronifizierung von atopischem Ekzem und Asthma bronchiale sein könnte.

Zusammen mit der eher hemmenden Wirkung des männlichen Geschlechtshormons Testosteron auf die IL-12 Produktion von MoDZs könnte dies den Geschlechtsunterschied in der Prävalenz dieser Erkrankungen teilweise erklären.

Die Induktion Th17-assoziiertes Zytokine durch hohe Konzentrationen von weiblichen und männlichen Geschlechtshormonen gleichermaßen liefert ebenfalls einen Hinweis auf die immunmodulatorische Rolle von Sexualhormonen auf Ebene der Zytokinsekretion Dendritischer Zellen. Dies könnte den Weg für neue Therapiekonzepte ebnen. Denkbar wäre eine gezielte Beeinflussung der Th1- und Th17-Immunantwort sowie gezielte Blockade von Hormonrezeptoren.

#### IV Literaturverzeichnis

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

Akdis, C.A. and Akdis, M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol* 123 (2009) 735-746.

Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., Klunker, S., Meyer, N., O'Mahony, L., Palomares, O., Rhyner, C., Ouaked, N., Schaffartzik, A., Van De Veen, W., Zeller, S., Zimmermann, M. and Akdis, C.A. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol* 127 (2011) 701-721.

Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124 (2006) 783-801.

Almqvist, C., Worm, M. and Leynaert, B. Impact of gender on asthma in childhood and adolescence: a GA2LEN review. *Allergy* 63 (2008) 47-57.

Araki, H., Katayama, N., Mitani, H., Suzuki, H., Nishikawa, H., Masuya, M., Ikuta, Y., Hoshino, N., Miyashita, H., Nishii, K., Minami, N. and Shiku, H. Efficient ex vivo generation of dendritic cells from CD14<sup>+</sup> blood monocytes in the presence of human serum albumin for use in clinical vaccine trials. *Br J Haematol* 114 (2001) 681-689.

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

Belfort, M.A., Saade, G.R., Suresh, M. and Vedernikov, Y.P. Effects of estradiol-17 beta and progesterone on isolated human omental artery from premenopausal nonpregnant women and from normotensive and preeclamptic pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 174 (1996) 246-253.

Belfort MA, S.G., Wen TS, Vedernikov YP. The direct action of 17 beta-estradiol in isolated omental artery from nonpregnant and pregnant women is related to calcium antagonism. *Am J Obstet Gynecol*. 175 (1996) 1163-1172.

Bengtsson, A.K., Ryan, E.J., Giordano, D., Magaletti, D.M. and Clark, E.A. 17beta-estradiol (E2) modulates cytokine and chemokine expression in human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 104 (2004) 1404-1410.

Berthois, Y., Katzenellenbogen, J.A. and Katzenellenbogen, B.S. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (1986) 2496-2500.

Bettelli, E., Korn, T., Oukka, M. and Kuchroo, V.K. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 453 (2008) 1051-1057.

Bieber, T. Atopic dermatitis. *N Engl J Med* 358 (2008) 1483-1494.

Bretscher, P.A. A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 185-190.

Burger, D. and Dayer, J.M. Cytokines, acute-phase proteins, and hormones: IL-1 and TNF-alpha production in contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci* 966 (2002) 464-473.

Cavani, A., Pennino, D. and Eyerich, K. Th17 and th22 in skin allergy. *Chem Immunol Allergy* 96 (2012) 39-44.

Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A. and Alber, G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 184 (1996) 747-752.

Chakir, J., Shannon, J., Molet, S., Fukakusa, M., Elias, J., Laviolette, M., Boulet, L.P. and Hamid, Q. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *J Allergy Clin Immunol* 111 (2003) 1293-1298.

Chen, W., Mempel, M., Schober, W., Behrendt, H. and Ring, J. Gender difference, sex hormones, and immediate type hypersensitivity reactions. *Allergy* 63 (2008) 1418-1427.

Dijkstra, A., Howard, T.D., Vonk, J.M., Ampleford, E.J., Lange, L.A., Bleecker, E.R., Meyers, D.A. and Postma, D.S. Estrogen receptor 1 polymorphisms are associated with airway hyperresponsiveness and lung function decline, particularly in female subjects with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 117 (2006) 604-611.

Dörner, K. Sexualsteroidhormone in: *Klinische Chemie und Hämatologie*. Thieme-Verlag Stuttgart 7. Auflage (2009) 248.

Douin-Echinard, V., Laffont, S., Seillet, C., Delpy, L., Krust, A., Chambon, P., Gourdy, P., Arnal, J.F. and Guery, J.C. Estrogen receptor alpha, but not beta, is required for optimal dendritic cell differentiation and [corrected] CD40-induced cytokine production. *J Immunol* 180 (2008) 3661-3669.

Eyerich, K., Pennino, D., Scarponi, C., Foerster, S., Nasorri, F., Behrendt, H., Ring, J., Traidl-Hoffmann, C., Albanesi, C. and Cavani, A. IL-17 in atopic eczema: linking allergen-specific adaptive and microbial-triggered innate immune response. *J Allergy Clin Immunol* 123 (2009) 59-66

Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., Cianfarani, F., Odorisio, T., Traidl-Hoffmann, C., Behrendt, H., Durham, S.R., Schmidt-Weber, C.B. and Cavani, A. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest* 119 (2009) 3573-3585.

Fanta, C.H. Asthma. *N Engl J Med* 360 (2009) 1002-1014.

Fish, E.N. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. *Nat Rev Immunol* 8 (2008) 737-744.

Furukawa, T. and Kurokawa, J. Regulation of cardiac ion channels via non-genomic action of sex steroid hormones: implication for the gender difference in cardiac arrhythmias. *Pharmacol Ther* 115 (2007) 106-115.

Gluck, J.C. The change of asthma course during pregnancy. *Clin Rev Allergy Immunol* 26 (2004) 171-180.

Goldrath, A.W. and Bevan, M.J. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402 (1999) 255-262

Gomez Real, F., Svanes, C., Bjornsson, E.H., Franklin, K.A., Gislason, D., Gislason, T., Gulsvik, A., Janson, C., Jogi, R., Kiserud, T., Norback, D., Nystrom, L., Toren, K., Wentzel-Larsen, T. and Omenaas, E. Hormone replacement therapy, body mass index and asthma in perimenopausal women: a cross sectional survey. *Thorax* 61 (2006) 34-40.

Grewe, M., Walther, S., Gyufko, K., Czech, W., Schopf, E. and Krutmann, J. Analysis of the cytokine pattern expressed in situ in inhalant allergen patch test reactions of atopic dermatitis patients. *J Invest Dermatol* 105 (1995) 407-410.

Harrop, J., Chinn, S., Verlato, G., Olivieri, M., Norback, D., Wjst, M., Janson, C., Zock, J.P., Leynaert, B., Gislason, D., Ponzio, M., Villani, S., Carosso, A., Svanes, C., Heinrich, J. and Jarvis, D. Eczema, atopy and allergen exposure in adults: a population-based study. *Clin Exp Allergy* 37 (2007) 526-535.

Jabeen, R. and Kaplan, M.H. The symphony of the ninth: the development and function of Th9 cells. *Curr Opin Immunol* 24 (2012) 303-307.

Jacoby, D.R. Einfluss von Pollen-assoziierten Lipidmediatoren (PALMs) auf Reifung und Zytokinproduktion von unterschiedlichen dendritischen Zell-Subpopulationen aus humanem peripherem Blut. Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigte Dissertation (2010) 42.

Jensen-Jarolim, E. and Untersmayr, E. Gender-medicine aspects in allergology. *Allergy* 63 (2008) 610-615.

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

Kiriyama, K., Sugiura, H. and Uehara, M. Premenstrual deterioration of skin symptoms in female patients with atopic dermatitis. *Dermatology* 206 (2003) 110-112.

Komi, J. and Lassila, O. Nonsteroidal anti-estrogens inhibit the functional differentiation of human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 95 (2000) 2875-2882.

Korn, T., Oukka, M., Kuchroo, V. and Bettelli, E. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol* 19 (2007) 362-371.

Lehner, M., Morhart, P., Stilper, A. and Holter, W. Functional characterization of monocyte-derived dendritic cells generated under serumfree culture conditions. *Immunol Lett* 99 (2005) 209-216.

Liu, H. and Leung, B.P. CD4+CD25+ regulatory T cells in health and disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33 (2006) 519-524.

MacSali, F., Real, F.G., Omenaas, E.R., Bjorge, L., Janson, C., Franklin, K. and Svanes, C. Oral contraception, body mass index, and asthma: a cross-sectional Nordic-Baltic population survey. *J Allergy Clin Immunol* 123 (2009) 391-397.

McKinley, L., Alcorn, J.F., Peterson, A., Dupont, R.B., Kapadia, S., Logar, A., Henry, A., Irvin, C.G., Piganelli, J.D., Ray, A. and Kolls, J.K. TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol* 181 (2008) 4089-4097.

Mellman, I. and Steinman, R.M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106 (2001) 255-258.

Mitchell, V.L. and Gershwin, L.J. Progesterone and environmental tobacco smoke act synergistically to exacerbate the development of allergic asthma in a mouse model. *Clin Exp Allergy* 37 (2007) 276-286.

Mohrenschlager, M., Schafer, T., Huss-Marp, J., Eberlein-Konig, B., Weidinger, S., Ring, J., Behrendt, H. and Kramer, U. The course of eczema in children aged 5-7 years and its relation to atopy: differences between boys and girls. *Br J Dermatol* 154 (2006) 505-513.

Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A. and Coffman, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136 (1986) 2348-2357.

Murray, R.D., New, J.P., Barber, P.V. and Shalet, S.M. Gonadotrophin-releasing hormone analogues: a novel treatment for premenstrual asthma. *Eur Respir J* 14 (1999) 966-967.

Napoletano, C., Pinto, D., Bellati, F., Taurino, F., Rahimi, H., Tomao, F., Panici, P.B., Rughetti, A., Frati, L. and Nuti, M. A comparative analysis of serum and serum-free media for generation of clinical grade DCs. *J Immunother* 30 (2007) 567-576.

Narita, S., Goldblum, R.M., Watson, C.S., Brooks, E.G., Estes, D.M., Curran, E.M. and Midoro-Horiuti, T. Environmental estrogens induce mast cell degranulation and enhance IgE-mediated release of allergic mediators. *Environ Health Perspect* 115 (2007) 48-52.

Nembrini, C., Marsland, B.J. and Kopf, M. IL-17-producing T cells in lung immunity and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 123 (2009) 986-994.

Paharkova-Vatchkova, V., Maldonado, R. and Kovats, S. Estrogen preferentially promotes the differentiation of CD11c<sup>+</sup> CD11b(intermediate) dendritic cells from bone marrow precursors. *J Immunol* 172 (2004) 1426-1436.

Papadopoulos, N.G., Agache, I., Bavbek, S., Bilo, B.M., Braido, F., Cardona, V., Custovic, A., Demonchy, J., Demoly, P., Eigenmann, P., Gayraud, J., Grattan, C., Heffler, E., Hellings, P.W., Jutel, M., Knol, E., Lotvall, J., Muraro, A., Poulsen, L.K., Roberts, G., Schmid-Grendelmeier, P., Skevaki, C., Triggiani, M., Vanree, R., Werfel, T., Flood, B., Palkonen, S., Savli, R., Allegri, P., Annesi-Maesano, I., Annunziato, F., Antolin-Amerigo, D., Apfelbacher, C., Blanca, M., Bogacka, E., Bonadonna, P., Bonini, M., Boyman, O., Brockow, K., Burney, P., Buters, J., Butiene, I., Calderon, M., Cardell, L.O., Caubet, J.C., Celenk, S., Cichocka-Jarosz, E., Cingi, C., Couto, M., Dejong, N., Del Giacco, S., Douladiris, N., Fassio, F., Fauquert, J.L., Fernandez, J., Rivas, M.F., Ferrer, M., Flohr, C., Gardner, J., Genuneit, J., Gevaert, P., Groblewska, A., Hamelmann, E., Hoffmann, H.J., Hoffmann-Sommergruber, K., Hovhannisyan, L., Hox, V., Jahnsen, F.L., Kalayci, O., Kalpaklioglu, A.F., Kleine-Tebbe, J., Konstantinou, G., Kurowski, M., Lau, S., Lauener, R., Lauerma, A., Logan, K., Magnan, A., Makowska, J., Makrinioti, H., Mangina, P., Manole, F., Mari, A., Mazon, A., Mills, C., Mingomataj, E.C., Niggemann, B., Nilsson, G., Ollert, M., O'Mahony, L., O'Neil, S., Pala, G., Papi, A., Passalacqua, G., Perkin, M., Pfaar, O., Pitsios, C., Quirce, S., Raap, U., Raulf-Heimsoth, M., Rhyner, C., Robson-Ansley, P., Alves,

R.R., Roje, Z., Rondon, C., Rudzeviciene, O., Rueff, F., Rukhadze, M., Rumi, G., Sackesen, C., Santos, A.F., Santucci, A., Scharf, C., Schmidt-Weber, C., Schnyder, B., Schwarze, J., Senna, G., Sergejeva, S., Seys, S., Siracusa, A., Skypala, I., Sokolowska, M., Spertini, F., Spiewak, R., Sprickelman, A., Sturm, G., Swoboda, I., Terreehorst, I., Toskala, E., Traidl-Hoffmann, C., Venter, C., Vlieg-Boerstra, B., Whitacker, P., Worm, M., Xepapadaki, P. and Akdis, C.A. Research needs in allergy: an EAACI position paper, in collaboration with EFA. *Clin Transl Allergy* 2 (2012) 21.

Pawankar, R., Canonica, G.W., Holgate, S.T. and Lockey, R.F., *WAO white book on allergy*, W. Organization. 2011, Milwaukee(WI). 1-216.

Pschyrembel, *Klinisches Wörterbuch*, 261. Auflage. 2007: Walther de Gruyter Verlag Berlin. 1769

Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R. and Deutzmann, R., Hormone der Gonaden in: *Duale Reihe Biochemie*, 3.Auflage 2012: Georg Thieme Verlag Stuttgart. 600-607

Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R. and Deutzmann, R., allgemeiner Überblick über die Biosynthese der Steroidhormone: in *Duale Reihe Biochemie*, 3.Auflage 2012: Georg Thieme Verlag Stuttgart. 589

Rebane, A., Zimmermann, M., Aab, A., Baurecht, H., Koreck, A., Karelson, M., Abram, K., Metsalu, T., Pihlap, M., Meyer, N., Fölster-Holst, R., Nagy, N., Kemeny, L., Kingo, K.I., Vilo, J., Illig, T., Akdis, M.b., Franke, A., Novak, N., Weidinger, S. and Akdis, C.A. Mechanisms of IFN-g induced apoptosis of human skin keratinocytes in patients with atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 129 (2012) 1297-1306.

Reid, S.D., Penna, G. and Adorini, L. The control of T cell responses by dendritic cell subsets. *Curr Opin Immunol* 12 (2000) 114-121.

Reis e Sousa, C., Hieny, S., Scharon-Kersten, T., Jankovic, D., Charest, H., Germain, R.N. and Sher, A. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med* 186 (1997) 1819-1829.

Ring, J. and Zumbusch, A., *Neurodermitis - Ursachen und Therapien.*, C.H. Beck'sche Verlagsbuchhandlung München. (2000) 31.

Rowley, D.A. and Fitch, F.W. The road to the discovery of dendritic cells, a tribute to Ralph Steinman. *Cell Immunol* 273 (2012) 95-98.

Ruiter, B. and Shreffler, W.G. The role of dendritic cells in food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 129 (2012) 921-928.

Schuler, G. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Eur J Immunol* 40 (2010) 2123-2130.

Schuler, G., Schuler-Thurner, B. and Steinman, R.M. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 15 (2003) 138-147.

Siracusa, M.C., Overstreet, M.G., Housseau, F., Scott, A.L. and Klein, S.L. 17beta-estradiol alters the activity of conventional and IFN-producing killer dendritic cells. *J Immunol* 180 (2008) 1423-1431.

Solano, M.E., Sander, V., Wald, M.R. and Motta, A.B. Dehydroepiandrosterone and metformin regulate proliferation of murine T lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 153 (2008) 289-296.

Souwer, Y., Szegedi, K., Kapsenberg, M.L. and de Jong, E.C. IL-17 and IL-22 in atopic allergic disease. *Curr Opin Immunol* 22 (2010) 821-826.

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

Stephens, J. Charcoal/Dextran Treated FBS, biochemical assay. [www.hyclone.com](http://www.hyclone.com) (2006)

Straub, R.H. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev* 28 (2007) 521-574.

Tarte, K., Fiol, G., Rossi, J.F. and Klein, B. Extensive characterization of dendritic cells generated in serum-free conditions: regulation of soluble antigen uptake, apoptotic tumor cell phagocytosis, chemotaxis and T cell activation during maturation in vitro. *Leukemia* 14 (2000) 2182-2192.

Traidl-Hoffmann, C., Jakob, T. and Behrendt, H. Determinants of allergenicity. *J Allergy Clin Immunol* 123 (2009) 558-566.

Trautmann, A., Schmid-Grendelmeier, P., Kruger, K., Cramer, R., Akdis, M., Akkaya, A., Brocker, E.B., Blaser, K. and Akdis, C.A. T cells and eosinophils cooperate in the induction of bronchial epithelial cell apoptosis in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 109 (2002) 329-337.

Wang, L. and Bosselut, R. CD4-CD8 lineage differentiation: Thpok-ing into the nucleus. *J Immunol* 183 (2009) 2903-2910.

Wilcoxon, S.C., Kirkman, E., Dowdell, K.C. and Stohlman, S.A. Gender-dependent IL-12 secretion by APC is regulated by IL-10. *J Immunol* 164 (2000) 6237-6243.

Yu, C.K., Liu, Y.H. and Chen, C.L. Dehydroepiandrosterone attenuates allergic airway inflammation in *Dermatophagoides farinae*-sensitized mice. *J Microbiol Immunol Infect* 35 (2002) 199-202.

Zaitso, M., Narita, S., Lambert, K.C., Grady, J.J., Estes, D.M., Curran, E.M., Brooks, E.G., Watson, C.S., Goldblum, R.M. and Midoro-Horiuti, T. Estradiol activates mast cells via a non-genomic estrogen receptor-alpha and calcium influx. *Mol Immunol* 44 (2007) 1977-1985.

Zhao, Y., Yang, J., Gao, Y.D. and Guo, W. Th17 immunity in patients with allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 151 (2010) 297-307.

## **V Dank**

Mein erster Dank geht an Frau Prof. Dr. med. Heidrun Behrendt (Leitung emerit. des Zentrums Allergie und Umwelt an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München (ZAUM)) und Herr Prof. Dr. rer. nat. Carsten Schmidt-Weber (Leiter des ZAUM) für die Möglichkeit, an ihrem Institut zu forschen.

Meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Claudia Traidl-Hoffmann möchte ich für die Überlassung des Themas und die hervorragende Unterstützung und Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit danken.

Besonders danken möchte ich Prof. Dr. med. Kilian Eyerich, Ph.D. und PD Dr. med. WenChieh Chen. Ihre exzellente Betreuung hat maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Zuletzt danke ich allen Mitarbeitern des ZAUM für die tolle Zusammenarbeit und Unterstützung.

## VI Anhang

Daten zu Abbildung 4.1-3

	Cpm
Serumfreies Medium	386,67±70,01
Hormonreduziertes Medium	2551,83±431,66

Daten zu Abbildung 4.1-4

	IL-23 pg/ml	IL-6 pg/ml
HuDZ+LPS	433,1610	124000,0000
HuDZ+LPS+E2 10-10M	596,8710	113000,0000
HuDZ+LPS+E2 10-5M	727,4460	133000,0000
IMDM+LPS	12,3680	12688,4600
IMDM+LPS+E2 10-10M	130,4440	20310,3200
IMDM+LPS+E2 10-5M	197,4950	52943,2200

Daten zu Abbildung 4.1-5

	IL-6 pg/ml	IL-12 pg/ml	IL-23 pg/ml
LPS	44506,91±6002,06	103,26±75,58	34,68±5,55
LPS+0,1% Ethanol	43587,29±4988,384	68,25±35,97	25,87±1,08

Daten zu Abbildung 4.1-6

	Cpm (T-Gedächtniszellen)	Cpm (naive T-Zellen)
LPS	1904,67±438,43	3123,3±457,10
LPS+0,1% Ethanol	1857±312,56	3378,4±620,55

Daten zu Abbildung 4.3-1

	CD80 MFI	CD83 MFI	CD86 MFI	CD40 MFI
LPS	8,1875± 3,3514	1,9800± 0,8474	24,4600± 5,7492	10,1425± 0,7092
17β-Estradiol 10-5M	8,3575± 3,5251	1,4825± 0,5872	31,7875± 9,8366	7,1400± 1,8636
Progesteron 10-5M	10,7425± 2,2587	1,8700± 0,7455	24,5850± 7,9657	11,6975± 1,2602
Testosteron 10-5M	8,5875± 2,9710	1,8075± 0,8788	32,4175± 12,1742	8,1600± 1,8696

	HLA DR MFI	HLA ABC MFI	CD1a MFI
LPS	15,0625± 6,1940	206,9350± 82,1944	22,2175± 9,5905
17β-Estradiol 10-5M	16,2325± 6,3126	182,3350± 74,9266	21,9000± 12,1125
Progesteron 10-5M	14,5000± 5,7605	206,8300± 70,9851	27,6675± 16,8339
Testosteron 10-5M	16,7575± 7,1542	186,6000± 69,2518	25,0200± 14,7493

Daten zu Abbildung 4.3-2

	IL-12 (fold induction)	IL-23 (fold induction)	IL-6 (fold induction)
LPS	1,0000±0	1,0000±0	1,0000±0
17β-Estradiol10-10M	1,1595± 0,1607	1,0005± 0,0434	1,0669± 0,0758
Progesteron 10-9M	0,9796± 0,1077	0,9406± 0,0970	0,9885± 0,1078
Testosteron 10-10M	0,8106± 0,0527	0,8581± 0,0692	1,2822± 0,1724

Daten zu Abbildung 4.3-3

	IL-12 (fold induction)	IL-23 (fold induction)	IL-6 (fold induction)
LPS	1,0000±0	1,0000±0	1,0000±0
17β-Estradiol 10-5M	1,6791± 0,2157	1,2264± 0,1802	1,2008± 0,0785
Progesteron 10-5M	1,0338± 0,0582	1,2465± 0,1246	0,9510± 0,0706
Testosteron 10-5M	0,9485± 0,0840	1,5628± 0,2187	1,1729± 0,0784

Daten zu Abbildung 4.4-1

	Cpm(fold induction)		Cpm(fold induction)
LPS	1,0000± 0,0000	LPS	1,0000± 0,0000
17β-Estradiol10-10M	1,1463± 0,1397	17β-Estradiol 10-5M	1,4059± 0,1434
Progesteron 10-9M	1,0464± 0,0768	Progesteron 10-5M	1,2691± 0,0867
Testosteron 10-10M	1,2370± 0,1508	Testosteron 10-5M	1,2396± 0,1706

Daten zu Abbildung 4.4-2

	IFN-γ (fold induction)	IL-17 (fold induction)	IL-22 (fold induction)
LPS	1,0000± 0,0000	1,0000± 0,0000	1,0000± 0,0000
17β-Estradiol10-10M	1,7182± 0,5048	1,3965± 0,2982	1,4263± 0,3761
Progesteron 10-9M	1,9594± 0,6989	0,9126± 0,2112	2,5979± 0,9605
Testosteron 10-10M	2,2401± 1,0056	2,3756± 0,8800	1,6812± 0,6198

	IL-10 (fold induction)
LPS	1,0000±0,0000
17β-Estradiol10-10M	2,1458±0,6796
Progesteron 10-9M	1,6055±0,3152
Testosteron 10-10M	1,7985±0,4581

Daten zu Abbildung 4.4-3

	IFN- $\gamma$ (fold induction)	IL-17 (fold induction)	IL-22 (fold induction)
LPS	1,0000 $\pm$ 0,0000	1,0000 $\pm$ 0,0000	1,0000 $\pm$ 0,0000
17 $\beta$ -Estradiol 10-5M	1,3575 $\pm$ 0,1675	1,3945 $\pm$ 0,0775	0,9575 $\pm$ 0,3475
Progesteron 10-5M	2,9465 $\pm$ 0,5855	2,1400 $\pm$ 0,6700	1,4255 $\pm$ 0,4605
Testosteron 10-5M	2,2170 $\pm$ 1,3210	1,3099 $\pm$ 0,1638	0,6355 $\pm$ 0,2145

	IL-10 (fold induction)
LPS	1,0000 $\pm$ 0,0000
17 $\beta$ -Estradiol 10-5M	1,1225 $\pm$ 0,2155
Progesteron 10-5M	1,32255 $\pm$ 0,01155
Testosteron 10-5M	1,13155 $\pm$ 0,20255

Daten zu Abbildung 4.4-5

	Cpm(fold induction)		Cpm(fold induction)
LPS	1,0000 $\pm$ 0,0000	LPS	1,0000 $\pm$ 0,0000
17 $\beta$ -Estradiol10-10M	1,4629 $\pm$ 0,1856	17 $\beta$ -Estradiol 10-5M	1,3224 $\pm$ 0,0940
Progesteron 10-9M	1,6384 $\pm$ 0,4969	Progesteron10-5M	1,4279 $\pm$ 0,3361
Testosteron 10-10M	1,4889 $\pm$ 0,3874	Testosteron 10-5M	1,3109 $\pm$ 0,1989

Daten zu Abbildung 4.4-6

	IFN- $\gamma$ (fold induction)	IL-22 (fold induction)	IL-10 (fold induction)
LPS	1,0000 $\pm$ 0,0000	1,0000 $\pm$ 0,0000	1,0000 $\pm$ 0,0000
17 $\beta$ -Estradiol10-10M	1,6196 $\pm$ 0,4665	0,9413 $\pm$ 0,0668	1,11 $\pm$ 0,077
Progesteron 10-9M	0,9491 $\pm$ 0,1798	0,6898 $\pm$ 0,2602	0,89 $\pm$ 0,10
Testosteron 10-10M	1,6876 $\pm$ 0,6266	1,2840 $\pm$ 0,4783	0,99 $\pm$ 0,053
17 $\beta$ -Estradiol 10-5M	2,8067 $\pm$ 1,8031	1,1243 $\pm$ 0,0186	1,09 $\pm$ 0,058
Progesteron 10-5M	1,5918 $\pm$ 0,2781	1,9359 $\pm$ 0,4171	0,94 $\pm$ 0,13
Testosteron 10-5M	0,8020 $\pm$ 0,2747	1,2805 $\pm$ 0,0985	1,055 $\pm$ 0,12