

**Generierung dendritischer Zellen aus Monozyten
innerhalb von 48 Stunden in vitro:
Rolle von Interferon-alpha bei der terminalen Differenzierung**

vorgelegt von
Jana Karina Junkmann
2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. A. Eigler

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Christian Rust
Prof. Dr. Rudolf Wank

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. M. Dauer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 20.01.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Dendritische Zellen	2
1.1.1	Subtypen dendritischer Zellen	2
1.1.2	Induktion einer Immunantwort	3
1.1.2.1	Antigenaufnahme und Antigenpräsentation durch dendritische Zellen	3
1.1.2.2	Ausreifung dendritischer Zellen und Expression von Oberflächenmarkern	4
1.1.2.3	Migration vom Ort der Antigenaufnahme in lymphatisches Gewebe	5
1.1.2.4	Interaktion dendritischer Zellen mit T-Zellen	7
1.1.2.5	Interaktion dendritischer Zellen mit natürlichen Killerzellen	8
1.1.2.6	Die Zytokinproduktion reifer dendritischer Zellen	8
1.1.2.6.1	IL-12	9
1.1.2.6.2	IL-23 und IL-27	9
1.1.2.6.3	IL-15	9
1.1.3	Dendritische Zellen als Vermittler immunologischer Toleranz	10
1.2	Interferon-alpha	10
1.2.1	Physiologie des Interferon-alpha	11
1.2.2	Einsatz von Interferon-alpha in der Klinik	12
1.3	Tumorimmunologie und Immuntherapie	13
1.3.1	Tumorimmunologie	13
1.3.2	Immunologisch basierte Tumorthherapie	15
1.4	Tumorthherapie mit dendritischen Zellen	16
1.5	Generierung dendritischer Zellen <i>in vitro</i>	17

1.5.1	Anforderungen an für den Einsatz in der Tumorthherapie vorgesehene <i>in vitro</i> generierte dendritische Zellen	17
1.5.1.1	Ausreifung	17
1.5.1.2	Ausbeute und Migration	17
1.5.1.3	Induktion einer Th1-gerichteten Immunantwort	18
1.5.1.4	Robustheit	18
1.5.2	Methoden zur <i>in vitro</i> Generierung dendritischer Zellen	19
1.5.3	Das Modell der sequenziellen Stimulation	20
1.5.4	Das <i>FastDC</i> -Konzept	20
1.6	Fragestellung	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Material	23
2.1.1	Geräte	23
2.1.2	Verbrauchsmaterial	23
2.1.3	Reagenzien	24
2.1.3.1	Chemikalien	24
2.1.3.2	Puffer und Medien	25
2.1.3.3	Zytokine und Chemokine	26
2.1.3.4	Peptide	26
2.1.3.5	Antikörper für die Durchflusszytometrie	27
2.1.3.6	Streptamere	27
2.1.3.7	Chemikaliensätze	28
2.1.4	Zelllinien	28
2.1.4.1	T2-Zellen	28
2.1.4.2	BHK-CD40L und BHK-pTCF	29
2.2	Methoden	29
2.2.1	Methoden der Zellkultur	29
2.2.1.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen	29
2.2.1.2	Häufig durchgeführte Prozeduren	29
2.2.1.2.1	Ermittlung der Vitalität	29
2.2.1.2.2	Ermittlung der Zellzahl	30

2.2.1.2.3	Lyse kontaminierender Erythrozyten	30
2.2.1.2.4	Zentrifugation	30
2.2.1.3	Monozytenisolation	30
2.2.1.4	Generierung dendritischer Zellen	31
2.2.1.4.1	<i>FastDC</i>	31
2.2.1.4.2	Unreife DC	31
2.2.1.4.3	Sequenziell stimulierte <i>FastDC</i>	31
2.2.1.4.4	<i>MigratoryFastDC</i>	31
2.2.1.4.5	α type1DC und α type1 <i>FastDC</i>	32
2.2.1.5	Isolation von pan-T-Zellen	32
2.2.1.6	Induktion antigenspezifischer T-Zellen	33
2.2.2	Analyseverfahren	34
2.2.2.1	Durchflusszytometrie	34
2.2.2.1.1	Bestimmung von Oberflächenmarkern	35
2.2.2.1.2	Identifizierung HLA-A2 positiver Probanden	36
2.2.2.1.3	Markierung des Chemokinrezeptors CCR7	36
2.2.2.1.4	Bestimmung der intrazellulären Interferon- gamma-Konzentration	36
2.2.2.1.5	MHC I-Multimer-Färbungen	37
2.2.2.1.6	<i>LAMP-assay</i>	38
2.2.2.2	Migration	39
2.2.2.3	^{51}Cr -release assay	41
2.2.2.4	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>	42
2.2.3	Statistik und Software	42
3	Ergebnisse	45
3.1	Einfluss von Interferon-alpha auf die Generierung von <i>FastDC</i>	45
3.1.1	Migration	45
3.1.1.1	Migration von <i>FastDC</i> im Vergleich mit <i>IFNαFastDC</i>	45
3.1.1.2	Der Einfluss der sequenziellen Stimulation auf die Migration von <i>FastDC</i> und <i>IFNαFastDC</i>	46
3.1.2	Zytokinproduktion der untersuchten <i>FastDC</i> -Populationen	46

3.1.3	Induktion einer peptidspezifischen CD8 ⁺ T-Zellantwort durch <i>FastDC</i> und <i>IFNαFastDC</i> unter dem Einfluss einer sequenziellen Stimulation	48
3.1.3.1	Expression des antigenspezifischen T-Zell-Rezeptors	49
3.1.3.2	Interferon-gamma Produktion	50
3.1.3.3	Spezifische Lyse	52
3.1.3.4	Messung der Frequenz antigenspezifisch-degranulierender CD8 ⁺ T-Zellen	55
3.2	Übertragung des <i>αtype1DC</i> -Protokolls auf <i>FastDC</i>	56
3.2.1	Die Expression von Oberflächenmarkern auf <i>FastDC</i> und <i>αtype1FastDC</i>	58
3.2.2	Migration von <i>FastDC</i> und <i>αtype1FastDC</i>	59
3.2.2.1	CCR7-Expression	60
3.2.3	Produktion von IL-12p70 durch <i>FastDC</i> und <i>αtype1FastDC</i>	61
4	Diskussion	64
4.1	Übersicht über die experimentellen Befunde	64
4.2	antigenspezifische CD8 ⁺ T-Zellen – Methodendiskussion	66
4.2.1	Induktion antigenspezifischer CD8 ⁺ T-Zellen	66
4.2.2	Ermittlung der Frequenz antigenspezifischer CD8 ⁺ T-Zellen	67
4.2.2.1	MHC-Multimere	68
4.2.2.2	Interferon-gamma Produktion	68
4.2.2.3	⁵¹ Cr-release assay	69
4.2.2.4	LAMP-assay	69
4.2.3	Kann der LAMP-assay andere Methoden ersetzen?	70
4.3	Chemokinrezeptorexpression und Migration	71
4.4	Die Problematik der IL-12p70 Defizienz	72
4.4.1	Der Einfluss von IFN α auf die IL-12p70 Sekretion dendritischer Zellen	73
4.4.2	Prostaglandin E ₂ hemmt die IL-12p70 Produktion dendritischer Zellen	73

4.4.3 Die Induktion einer Th1-Antwort in IL-12p70-defizienten Ko- kulturen	74
4.5 <i>IFNαFastDC</i> im Vergleich zu anderen Protokollen	75
4.6 Die sequenzielle Stimulation	77
4.7 Der Stellenwert von <i>αtype1FastDC</i> als alternatives Ausreifungsprotokoll	78
4.8 Annäherung an die Physiologie dendritischer Zellen	79
4.9 Klinische Relevanz	81
4.10 Weiterführende Ansätze	82
5 Zusammenfassung	85
Literaturverzeichnis	87
Abkürzungsverzeichnis	104
Danksagung	106
Veröffentlichungen	107
Lebenslauf	108

1 Einleitung

Das Immunsystem ist essenziell für unser Überleben. Aber es ist auch an einer Vielzahl medizinischer Probleme beteiligt: Pathogene entziehen sich seiner Kontrolle – eine Infektion wird bedrohlich. Es tritt ein Fehler in der Unterscheidung zwischen selbst und fremd auf – eine Autoimmunerkrankung entsteht. Maligne Zellen unterlaufen seine Kontrollmechanismen – eine Tumorerkrankung wird manifest.

Dendritische Zellen (DC) sind die Schaltzentralen des Immunsystems. Sie nehmen Signale der Umgebung und Bestandteile von Pathogenen auf, transportieren sie in den Lymphknoten und initiieren dort eine adaptive Immunantwort. Sie gelten als Brücke zwischen der angeborenen Immunität, die Pathogenbestandteile mit Hilfe genetisch kodierter Rezeptoren erkennt, und der adaptiven Immunität, die über rearrangierte Gene eine große Vielfalt an antigenspezifischen Zellen zur Verfügung stellt. Auf diese Weise wird die Entstehung eines immunologischen Gedächtnisses ermöglicht [Banchereau und Palucka 2005].

Die Medizin greift an verschiedenen Stellen in das Immunsystem ein: Impfungen verhindern Infektionskrankheiten, Patienten mit Autoimmunerkrankungen und organtransplantierte Patienten werden immunsuppressiv behandelt, und auch im Rahmen der Therapie maligner Tumore gewinnen immuntherapeutische Konzepte an Einfluss [Guinn 2007]. Eine besondere Rolle spielen in diesem Zusammenhang DC. Über sie können antigenspezifische Immunantworten ebenso initiiert werden wie Toleranz gegenüber ausgewählten Immunogenen [Steinman und Nussenzweig 2002]. In zu therapeutischen Zwecken ausreichender Menge können DC nicht aus dem Blut isoliert werden, und die Vorgänge bei der Differenzierung und Ausreifung von DC *in vivo* sind noch nicht lückenlos bekannt. Die *in vitro* Generierung einer therapeutisch möglichst gut nutzbaren DC ist Hintergrund dieser Arbeit.

1.1 Dendritische Zellen

1.1.1 Subtypen dendritischer Zellen

Die Vorläuferzellen und Differenzierungswege von DC *in vivo* sind noch nicht vollständig geklärt, und auch die Möglichkeiten unterschiedlicher DC Populationen sich ineinander umzuwandeln sind noch weitgehend unbekannt. Ob *in vitro* generierte DC mit *in vivo* vorliegenden DC-Populationen vollständig vergleichbar sind ist ebenfalls unklar [Banchereau und Palucka 2005]. *In vivo* werden von den meisten Autoren drei DC-Subpopulationen unterschieden, alle drei ausgehend von einer *cluster of differentiation*(CD) 34^+ hämatopoietischen Stammzelle: Erstens Langerhans Zellen, diese entstehen über eine CD $11c^+$, CD 14^- Vorläuferzelle, zweitens myeloide DC (mDC), die aus CD $11c^+$, CD 14^+ Vorläuferzellen hervorgehen. Die dritte Population bilden die der lymphoiden Reihe zugeordneten plasmazytoiden DC (pDC), die vermutlich aus CD $11c^-$, CD 14^- Vorläuferzellen entstehen [O'Neill 2004, Shortman und Liu 2002, Banchereau und Palucka 2005]. Die Populationen unterscheiden sich nicht nur bezüglich ihrer Lokalisation – Langerhans Zellen in der Epidermis, pDC vor allem im Blut und in lymphatischem Gewebe, mDC in verschiedensten Organen –, sie weisen auch eine unterschiedliche Ausstattung mit *Pattern-recognition*-Rezeptoren (PRR) des angeborenen Immunsystems auf [Ueno 2007]. pDC sind zudem in der Lage, große Mengen an Interferon (IFN) α zu produzieren [Siegal 1999]. Vor kurzem konnten zwei Gruppen unabhängig voneinander im Mausmodell eine weitere DC-Subpopulation identifizieren: *Interferon-producing-killer-DC* vereinen Eigenschaften von DC und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) in einer Zelle [Taieb 2006, Chan 2006].

Da die Isolation reifer DC aus dem Blut nicht zu einer ausreichenden Zellzahl führt, werden für *in vitro* Studien und klinische Studien zumeist aus Monozyten abgeleitete DC verwendet. Die folgenden Erläuterungen beziehen sich, soweit nicht explizit anders erwähnt, auf mDC, denen die im Rahmen dieser Arbeit aus Monozyten generierten *FastDC* (S.20) am ehesten entsprechen.

1.1.2 Induktion einer Immunantwort– Übergang zur adaptiven Immunität

Es dauert drei bis fünf Tage, bis das Immunsystem eine adaptive Immunantwort mit klonaler Expansion von Lymphozyten etabliert hat [Janeway und Medzhitov 2002]. DC sind entscheidend an diesem Vorgang beteiligt: als Sensoren in der Peripherie, die Antigenkonstellationen und Informationen aus dem inflammatorischen Gewebe aufnehmen, diese dann in den Lymphknoten transportieren und dort in die entsprechende Immunantwort übersetzen [Pulendran 2001]. Im Folgenden soll auf die einzelnen Elemente der Induktion einer adaptiven Immunantwort durch DC näher eingegangen werden.

1.1.2.1 Antigenaufnahme und Antigenpräsentation durch dendritische Zellen

DC können *in vivo* Antigene phagozytieren, über Pino- oder Endozytose aufnehmen, oder sich spezifischer Rezeptoren zur Aufnahme von Immunkomplexen, toten Zellen oder Zelltrümmern und mikrobiellen Pathogenen bedienen [Rossi und Young 2005]. Exogene Antigene werden in der Regel auf dem *major histocompatibility complex* (MHC) II präsentiert, endogene auf MHC I [O'Neill 2004]. Die Präsentation exogener Antigene auf MHC I wird als Kreuzpräsentation bezeichnet. Sie ist essenziell zur Induktion einer CD8⁺T-Zell -Antwort gegen exogene Pathogene, beispielsweise im Rahmen einer viralen Infektion. Aber auch Immunantworten gegen maligne Tumore oder transplantierte Gewebe werden auf diesem Weg vermittelt [Banchereau 2000, O'Neill 2004]. Nicht nur T-Zellen, denen prozessierte Peptide präsentiert werden, treten in Kontakt mit DC: B-Zellen erhalten über DC Zugang zu nativen Antigenen, NK Zellen zu eigenen und mikrobiellen Glycolipiden [Steinman und Banchereau 2007].

Die Präsentation von Antigenen wird zur Verhinderung der Induktion einer Autoimmunantwort durch verschiedene Mechanismen reguliert. Aktivierte DC nehmen nur während eines kurzen Zeitraumes Antigen auf, danach wird die Antigenaufnahme wieder eingestellt um die Verwendung irrelevanter Antigene zu verhin-

den [Banchereau und Steinman 1998]. *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) sind eine Gruppe zur angeborenen Immunität gehörender, unter anderem mikrobielle und virale Fragmente erkennender Rezeptoren. Von DC werden im Rahmen einer Immunantwort nur die Antigene präsentiert, die zusammen mit TLR-Agonisten aufgenommen wurden. Auf diese Weise wird die Präsentation irrelevanter Antigene verhindert [Blander und Medzhitov 2006]. Nach Ausreifung der DC werden die Antigene mehrere Tage stabil auf der Oberfläche der Zelle präsentiert [Banchereau 2000].

1.1.2.2 Ausreifung dendritischer Zellen und Expression von Oberflächenmarkern

Nur reife DC sind zur Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort in der Lage. Unreife DC induzieren im Zusammenspiel mit regulatorischen T-Zellen immunologische Toleranz (S.10) [Mahnke 2002]. Im Rahmen der Ausreifung der Zellen wird die Antigenaufnahme herunterreguliert, das Migrationsverhalten der DC ändert sich und kostimulatorische Moleküle werden zusammen mit den MHC-Antigenkomplexen auf der Zelloberfläche exprimiert. Verschiedene Mediatoren können die Ausreifung von DC auslösen, im Allgemeinen werden sie zu drei Gruppen zusammengefasst:

- **Mikrobielle Produkte**, wie zum Beispiel Cytosin-phosphatidyl-Guanosin (CpG)- Motive bakterieller DNA, virale Doppelstrang-RNA, Lipopolysaccharid (LPS) oder *polyinosinic-polycytidylic acid* (pI:C), wie auch Fragmente nekrotischer Zellen werden von den PRR des angeborenen Immunsystems erkannt [Shortman und Liu 2002]. Neben den bereits erwähnten TLR werden DC noch von einigen anderen PRR aktiviert, eine Übersicht findet sich bei Lee und Iwasaki 2007 [Lee und Iwasaki 2007].
- **Proinflammatorische Zytokine und Prostaglandine**: Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α , Interleukin (IL)- 1β , Prostaglandin-E₂ (PGE₂) und IL-6 werden momentan als Standardkombination für die *in vitro* DC-Generierung verwendet [Banchereau und Palucka 2005].

- **Von T-Zellen ausgehende Signale:** Hier spielt vor allem die Interaktion zwischen CD40 auf der DC-Oberfläche und dem von T-Zellen exprimierten CD40-Liganden (CD40L) eine Rolle [van Kooten und Banchereau 2000].

Dass ein reifer Phänotyp nicht mit der terminalen Ausreifung der DC gleichzusetzen ist, konnte kürzlich in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden. Erst nach Kontakt mit von T-Zellen ausgehenden Signalen ist die DC in der Lage, über einen längeren Zeitraum die für eine reife DC charakteristischen Oberflächenmarker zu exprimieren. Zudem wird durch diesen Vorgang das Überleben der DC gefördert [Dauer 2006].

Zu den auf aktivierten DC hochregulierten Oberflächenmarkern gehören unter anderem MHC II, die auch als B-Zell-stimulatorischer Komplex B7 zusammengefassten Marker CD80 und CD86, sowie CD83 [Banchereau und Steinman 1998, Cella 1997]. Die Rolle von CD83, dessen Expression als Reifemarker angesehen wird, ist noch nicht abschließend geklärt. Diskutiert werden regulatorische Einflüsse auf die DC-Population und Einflüsse auf die Entwicklung von CD8⁺T-Zellen [Lechmann 2002]. Die erwähnten Oberflächenmarker sind lediglich eine für mDC gültige Auswahl aus einer Vielzahl möglicher Marker, die aufgrund ihrer Verwendung im experimentellen Teil dieser Arbeit getroffen wurde. Andere häufig zur Bestimmung des Aktivierungs- oder Ausreifungsgrades von DC verwendete Marker sind das auf ausgereiften DC herunterregulierte CD209 sowie CD1a. Eine Übersicht gängiger Oberflächenmarker findet sich bei Rossi und Young [Rossi und Young 2005].

1.1.2.3 Migration vom Ort der Antigenaufnahme in lymphatisches Gewebe

Monozyten und unreife DC exprimieren Rezeptoren für in inflammatorischem Gewebe exprimierte Chemokine (CXCR1, CCR1, CCR2, CCR5), die sie befähigen in entzündliches Gewebe einzuwandern. Bereits eine Stunde nach Induktion der DC-Ausreifung werden die oben erwähnten Rezeptoren durch CXCR4, CCR4 und die Hochregulation von CCR7 ersetzt. DC können jetzt aus dem inflammatori-

schen Gewebe in den Lymphknoten migrieren [Banchereau 2000, Sallusto 2000]. Das migratorische Verhalten von DC ist somit eng an die Ausreifung gekoppelt [Banchereau und Palucka 2005].

Der Chemokinrezeptor CCR7 gilt als wichtiger Regulator der Lymphknoten-gerichteten Migration sowohl für DC, als auch für B- und T-Lymphozyten. Es sind zwei CCR7 Liganden bekannt: CCL19 und CCL21 [Förster 2008]. CCL19 wird von Stromazellen der T-Zellzone des Lymphknotens und von DC an der luminalen Seite hochendothelialer Venolen exprimiert. CCL21 ist ebenfalls auf Stromazellen in der T-Zellzone und zusätzlich in hochendothelialen Venolen und im Endothel afferenter lymphatischer Gefäße nachweisbar [Sánchez-Sánchez 2006, Riol-Blanco 2005]. Förster et al. konnten die entscheidende Rolle des CCR7 bei der Induktion einer Immunantwort im Mausmodell nachweisen: *CCR7-knockout*-Mäuse haben eine gestörte Lymphknotenarchitektur: DC und T-Zellen dieser Mäuse können nicht in die Lymphknoten einwandern [Förster 1999, Gunn 1999].

Sowohl reife als auch unreife DC exprimieren CCR7, im Rahmen der Ausreifung wird die Expression des Chemokinrezeptors jedoch hochreguliert, die Migration der DC in den Lymphknoten nimmt erheblich zu und die Induktion einer adaptiven Immunantwort wird ermöglicht. Neben der Migration fördert der Kontakt von CCR7 mit CCL19 auch die Dendritenbildung. Beide Liganden unterstützen das Überleben, die Ausreifung und, aus bislang ungeklärten Gründen, auch die Endozytose der DC [Sánchez-Sánchez 2006, Yanagawa und Onoe 2002, Marsland 2005]. Dass CCR7 auch Anteil an der Entstehung immunologischer Toleranz hat wurde in den letzten Jahren von verschiedenen Gruppen nachgewiesen. Ohl et al. konnten im Mausmodell zeigen, dass die Migration unreifer, toleranzinduzierender DC in den Lymphknoten grundsätzlich CCR7-abhängig ist, der exakte Mechanismus ist jedoch bislang ungeklärt [Förster 2008, Ohl 2004, Mahnke 2002]. Der chemotaktische Einfluss der CCR7- Liganden auf unreife DC ist *in vitro* nicht nachweisbar [Caux 2002].

1.1.2.4 Interaktion dendritischer Zellen mit T-Zellen

T-Zellen werden in zytotoxische CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Helfer (Th) Zellen unterteilt, letztere nochmals in die CD8⁺-Antworten unterstützende Th1- und die Differenzierung von B-Zellen fördernde Th2-Zellen [Mosmann 1986]. Die Induktion einer Th1 oder Th2 Antwort ist oft entscheidend für den Erfolg einer Immunreaktion. Für die Tumorzelllyse ist eine Th1-Differenzierung der CD4⁺ T-Helfer Zellen erforderlich [Nishimura 2000, Pulendran 2001]. Die Th1- oder Th2-Differenzierung der CD4⁺ T-Helfer Zellen ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Neben dem vorherrschenden Zytokinmilieu – IL-12p70 und IFN γ erzeugen eine Th1-, IL-4 und IL-10 eine Th2-Antwort [O'Garra 1998] – spielt das Verhältnis der Anzahl verfügbarer DC zu der vorhandenen T-Zellen ebenso eine Rolle wie die Antigenkonzentration, Antigenbindungsstärke und Dauer der Antigenexposition [Constant und Bottomly 1997, Iezzi 1999, Tanaka 2000, Langenkamp 2000]. Dazu kommt der Einfluss kostimulatorischer Moleküle auf der Oberfläche der DC, vor allem des CD80/CD86 Komplexes, der an CD28 auf allen T-Zellen und zusätzlich an CD152 auf aktivierten T-Zellen bindet [Kuchroo 1995].

Vor diesem Hintergrund entwickelten Kalinski et al. ein Modell der Induktion antigenspezifischer T-Zellen durch DC, dass drei von der DC ausgehende Signale vorsieht [Kalinski 1999a]:

- Das auf dem MHC präsentierte Antigen – Information über die Identität des Pathogens
- Kostimulatorische Moleküle auf der DC-Oberfläche und humorale Signale – Information über dessen pathogenes Potenzial
- Ein drittes Signal, das ausgehend von der Reaktion des infizierten Gewebes die Th1- oder Th2-Differenzierung der Th Zellen vermittelt – die Information über die pathogenvermittelte Gewebereaktion wird in den Lymphknoten transportiert.

Die Aktivierung einer CD8⁺T-Zellantwort kann zunächst Th1-unabhängig erfolgen. Um allerdings CD8⁺T-Gedächtniszellen zu erzeugen ist eine T-Helferzelle erforderlich [Janssen 2003, Shedlock und Shen 2003]. Die DC ist in der Lage, den stattgehabten Kontakt zur Th-Zelle zu speichern: Zytotoxische T-Zellen und Th-Zellen müssen nicht gleichzeitig an die DC binden. Dieser Vorgang des *licensing* der DC ist CD40-abhängig und kann *in vitro* unter Verwendung von CD40L imitiert werden [Ridge 1998, Bennett 1998].

1.1.2.5 Interaktion dendritischer Zellen mit natürlichen Killerzellen

10-15 % der im Blut zirkulierenden Lymphozyten sind NK-Zellen, die als Bestandteil des angeborenen Immunsystems gelten. NK-Zellen erkennen ihre Zielzellen über einen komplexen, noch nicht vollständig verstandenen Mechanismus, der auf der MHC I Expression der Zielzellen sowie einem zusätzlichen Aktivierungssignal beruht [Caligiuri 2008]. Aktivierte NK-Zellen setzen IFN γ frei und unterstützen so die Th1-Wichtung einer Immunantwort und die Ausreifung von DC [Mailliard 2003, Rossi und Young 2005]. Umgekehrt aktivieren DC NK-Zellen, indem sie das neben der Zielzellerkennung erforderliche zweite Signal zur Zielzelllyse liefern. Unter anderem spielen hier IFN α (S.10) und IL-18 eine Rolle [Mailliard 2003].

1.1.2.6 Die Zytokinproduktion reifer dendritischer Zellen

Reife DC produzieren, abhängig von der Population und den Bedingungen unter denen ihre Ausreifung erfolgt ist verschiedene Zytokine, über die sie Einfluss auf die weitere Immunantwort ausüben. Die Akute-Phase-Proteine IL-1, IL-6 und TNF spielen hier ebenso eine Rolle wie IL-15, IFN α und die Zytokine der IL-12-Gruppe (IL-12, IL-23 und IL-27) [Waldmann 2006, Blanco 2008]. Die im Rahmen dieser Arbeit berücksichtigten Zytokine sollen im Folgenden kurz charakterisiert werden, eine ausführliche Erläuterung der Rolle des IFN α findet sich auf Seite 10.

1.1.2.6.1 IL-12 besteht aus den zwei Untereinheiten p40 und p35, die zusammen das bioaktive IL-12p70 bilden. Das p40 Homodimer ist ein Antagonist des IL-12p70 Heterodimers [Gately 1998, Ling 1995]. Neben DC können auch Makrophagen, Monozyten und neutrophile Granulozyten IL-12p70 sezernieren [del Vecchio 2007]. Unter IL-12p70 Einfluss entwickeln sich naive T-Zellen beim initialen Antigenkontakt in Richtung Th1. Zusätzlich ist IL-12p70 ein Kofaktor bei der Induktion maximaler IFN γ Sekretion durch Th1 Zellen [Gately 1998]. Auch zur Reaktivierung und zur Förderung des Überlebens von CD4⁺Gedächtnis-T-Zellen ist IL-12p70 bedeutsam. Zudem besitzt es eine die zytotoxische Aktivität natürlicher Killerzellen stimulierende und die Neoangiogenese inhibierende Wirkung [Trinchieri 1995, del Vecchio 2007].

Zur Induktion der IL-12p70 Freisetzung aus DC ist eine Kombination verschiedener Signale notwendig. Die p35 und p40 Untereinheiten werden unabhängig voneinander reguliert. Es gibt einige Hinweise darauf, in welchen Kombinationen Stimulationen der PR-Rezeptoren des angeborenen Immunsystems zusammen mit T-Zell abhängigen Faktoren – das CD40-CD40L System und IFN γ spielen hier eine entscheidende Rolle – die IL-12p70 Produktion der DC induzieren. Vollständig geklärt ist diese Frage aber nicht [Cella 1996, Snijders 1998, del Vecchio 2007]. Die IL-12p70 Ausschüttung von DC ist auf eine Zeitspanne von 16-18 Stunden nach der Aktivierung begrenzt [Kalinski 1999, Langenkamp 2000].

1.1.2.6.2 IL-23 und IL-27 sind dem IL-12 verwandte Zytokine, deren Funktion noch nicht vollständig geklärt ist. IL-23 konnte bislang hauptsächlich im Kontext autoimmuner Reaktionen nachgewiesen werden, IL-27 besitzt sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften [Blanco 2008].

1.1.2.6.3 IL-15 kann von einer Vielzahl verschiedener Zellen gebildet werden, als Hauptsyntheseorte gelten aber Monozyten und DC [Waldmann 2006]. Ein Großteil des IL-15 liegt membrangebunden vor [Dubois 2002]. Neben der Förderung der Im-

munglobulinproduktion und Proliferation von B-Zellen und der Ausreifung sowie des Überlebens von NK-Zellen hat IL-15 einige gerade im Rahmen tumortherapeutischer Ansätze relevante Effekte auf T-Zellen: Es induziert die Proliferation aktivierter CD4⁺T-Zellen, stimuliert zytotoxische Lymphozyten und fördert die Bildung von CD8⁺-Gedächtniszellen [Waldmann 2006, Fehniger 2002]. Einige Studien konnten zeigen, dass IFN α die IL-15 Expression steigert [Santini 2000, Yamaji 2006].

1.1.3 Dendritische Zellen als Vermittler immunologischer Toleranz

Die Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen wird zu einem erheblichen Teil im Thymus erzeugt. Ein Teil der möglichen Antigene kann jedoch nicht im Thymus exprimiert werden, andere treten erst im Verlauf des Lebens in Erscheinung [Banchereau und Palucka 2005]. DC spielen sowohl bei der Induktion der zentralen, im Thymus erzeugten, als auch im Rahmen der peripheren Toleranz eine entscheidende Rolle [Steinman und Nussenzweig 2002].

In den Lymphknoten migrierte unreife DC vermitteln Toleranz. Dhodapkar et al. konnten dies *in vivo* im Rahmen einer Vakzinestudie an gesunden Probanden beobachten [Lee und Iwasaki 2007, Dhodapkar 2001]. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass unreife DC sowohl direkt über die Eliminierung autoreaktiver T-Zellen, als auch indirekt über die Induktion regulatorischer T-Zellen Toleranz induzieren können [Steinman 2003]. Des Weiteren stellen reife DC Kostimulatoren bereit, die zum Erhalt thymusinduzierter regulatorischer T-Zellen beitragen und so überschießende Immunantworten verhindern [Coquerelle und Moser 2008].

1.2 Interferon-alpha

IFN α wurde 1957 von Isaacs und Lindemann erstmals beschrieben. Die bekannten 13 Subtypen binden an einen gemeinsamen Rezeptor [Isaacs und Lindenmann 1957,

Bracci 2007]. Mit $\text{IFN}\beta$ wird $\text{IFN}\alpha$ zur Gruppe der Typ I Interferone zusammengefasst, $\text{IFN}\gamma$ wird auch als Typ II Interferon bezeichnet.

1.2.1 Physiologie des Interferon-alpha

$\text{IFN}\alpha$ gehört zu Gruppe der ersten bei Aktivierung des Immunsystems freigesetzten Zytokine [Brassard 2002]. Alle kernhaltigen Zellen können im Rahmen einer viralen oder bakteriellen Infektion und nachdem sie Stressoren, beispielsweise einer Bestrahlung, ausgesetzt waren $\text{IFN}\alpha$ produzieren. Zudem besitzen alle kernhaltigen Zellen einen $\text{IFN}\alpha$ Rezeptor, das Zytokin übt möglicherweise die Funktion eines ubiquitären Warnsignals aus [Brassard 2002, Tough 2004]. Die Hauptproduzenten von humanem $\text{IFN}\alpha$ sind pDC. Sie setzen nach Stimulation von PRR des angeborenen Immunsystems bis zu 1000-fach mehr $\text{IFN}\alpha$ als andere Zellen frei [Fitzgerald-Bocarsly 1993, Tough 2004].

Über die $\text{IFN}\alpha$ -Effekte auf die Differenzierung und Ausreifung von DC wird der Übergang zur adaptiven Immunität gefördert. Den Einfluss von $\text{IFN}\alpha$ auf die DC Differenzierung konnten Blanco et al. 2001 erstmals zeigen: Monozyten differenzierten im Serum von Patienten mit systemischem Lupus Erythematoses, das hohe $\text{IFN}\alpha$ -Konzentrationen enthält, spontan zu DC. Unter Zugabe $\text{IFN}\alpha$ neutralisierender Antikörper blieb der Effekt aus [Blanco 2001]. Auch die Ausreifung von DC wird von $\text{IFN}\alpha$ gefördert: Kostimulatorische Oberflächenmoleküle wie CD80, CD86, der Reifeindikator CD83 und auch MHC I und MHC II werden hochreguliert [Radvanyi 1999, Luft 1998]. Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass $\text{IFN}\alpha$ die Kreuzpräsentation fördert [le Bon 2003]. Die $\text{IFN}\alpha$ -Effekte auf DC sind nicht unumstritten und erheblich vom Zeitpunkt der Exposition, dem umgebenden Zytokinmilieu sowie weiteren vorhandenen Zellpopulationen abhängig [Tosi 2004, Gauzzi 2002, McRae 2000, Dauer 2003].

Die Zytotoxizität von CD8^+ T-Zellen wird von $\text{IFN}\alpha$ gefördert, ebenso deren klonale Expansion und der Erhalt der Population an Gedächtnis-T-Zellen. Zudem kommt

es zu einer Hochregulation des IL-12 Rezeptors und so zur Begünstigung einer Th1-Antwort [Tough 1996, le Bon 2003, Brassard 2002]. Auch NK-Zellen werden in ihrer Funktion von $\text{IFN}\alpha$ beeinflusst. Es ermöglicht als zweites Signal neben der Zielzellerkennung die Zielzellyse (S.8). Die $\text{IFN}\alpha$ Defizienz im Rahmen einer Tumorerkrankung wird als eine Ursache für das Versagen der NK-Zellen in dieser Situation, aber auch als möglicher Mechanismus für den positiven Effekt von $\text{IFN}\alpha$ in der Tumorthherapie diskutiert [Mailliard 2003, Brassard 2002].

1.2.2 Einsatz von Interferon-alpha in der Klinik

$\text{IFN}\alpha$ wird heute vor allem in zwei großen Bereichen therapeutisch eingesetzt: Zum einen in der antiviralen Therapie, den Schwerpunkt bildet dabei die Therapie der Hepatitis C. Zum anderen in der Tumorthherapie, vor allem in der Therapie der Haarzelleukämie, des Nierenzellkarzinoms, des malignen Melanoms und der chronisch myeloischen Leukämie. Zwar konnten Gresser et al. bereits 1969 im Mausmodell antitumoröse Effekte des $\text{IFN}\alpha$ nachweisen, ein Einsatz in größeren klinischen Studien war aber erst möglich, nachdem das Zytokin 1981 rekombinant synthetisiert werden konnte [Gresser 1969, Goeddel 1981, Borden 2005]. Seit einigen Jahren wird vor allem in der Therapie der Hepatitis C, aber auch in der Tumorthherapie zunehmend mit Polyethylenglycolen kovalent verbundenes $\text{IFN}\alpha$ verwendet. Es bietet eine durch stabile Wirkspiegel gekennzeichnete Pharmakokinetik. Das *outcome* der Patienten wird sowohl im Rahmen der antiviralen- als auch der Tumorthherapie verbessert [Glue 2000, Borden 2005].

An den antitumorösen Eigenschaften von $\text{IFN}\alpha$ sind verschiedene Mechanismen beteiligt. Zum einen sind hier die direkten Auswirkungen auf Tumorzellen zu nennen: Hemmung der Proliferation, verstärkte Expression von MHC I, Apoptoseinduktion und Inhibition der Neoangiogenese sind wichtige Mechanismen. Zum anderen spielen aber auch die bereits erläuterten Interaktionen über Zellen des Immunsystems eine Rolle (S.11) [Murphy 2001, Lindahl 1976, Egle 1996, Sidky und Borden 1987].

1.3 Tumorimmunologie und Immuntherapie

Die Interaktionen zwischen Tumorzellen und dem humanen Immunsystem sind vielfältig und noch nicht vollständig aufgeklärt. An dieser Stelle soll ein kurzer Überblick über die Thematik geboten werden, um die Rolle *in vitro* generierter DC in der Tumortherapie zu verdeutlichen.

1.3.1 Tumorimmunologie

Interaktionen zwischen dem Immunsystem und malignen Tumoren sind seit langer Zeit bekannt, erste Hinweise darauf entstammen Experimenten von Paul Ehrlich Anfang des 20. Jahrhunderts [Ehrlich 1909]. Basierend auf einer in den fünfziger Jahren des letzten Jahrhunderts geäußerten Hypothese von Burnet und Thomas, dass das Immunsystem die maligne Transformation körpereigener Zellen erkennt und diese eliminiert, formulierten Dunn et al. 2004 ein als *cancer immunoediting* bezeichnetes dreistufiges Konzept zur Interaktion zwischen malignen Tumoren und dem Immunsystem [Burnet 1957, Dunn 2004]. Die erste, als *elimination* bezeichnete Stufe sieht die Erkennung und Elimination der transformierten Zellen vor, es entsteht keine Erkrankung. Können die Tumorzellen nicht vollständig eliminiert, aber zumindest ihre Expansion kontrolliert werden, kommt es zum *equilibrium*. Wenn auch letzteres nicht mehr möglich ist, so wird die Erkrankung manifest, der Tumor wächst und tritt schließlich klinisch in Erscheinung: *escape* [Dunn 2004].

Tumorzellen entziehen sich auf verschiedenen Wegen der Kontrolle des Immunsystems. Die im Folgenden angeführten Mechanismen stellen nur eine Auswahl dar, der Schwerpunkt liegt auf der Beeinflussung von DC. Resistenzmechanismen gegen die durch zytotoxische Lymphozyten induzierte Tumorzelllyse, – als Beispiele seien hier die Inhibierung des durch Granzyme oder Perforin initiierten Apoptoseweges sowie die Überexpression antiapoptotische Moleküle genannt – kommen ebenso zum Tragen wie die Induktion einer CD4⁺T-Zell- und CD8⁺T-Zell-Anergie sowie die

Herunterregulation der MHC-I Komplexe [Crocì 2007, Rabinovich 2007]. Daneben findet sich im Blut von Tumorpatienten häufig eine erhöhte Anzahl regulatorischer T-Zellen. Diese können neben ihrer spezifischen suppressiven Funktion auch die Metastasierung erleichtern [Liyanage 2002, Crocì 2007]. Die Anzahl regulatorischer T-Zellen im Gewebe von Ovarialkarzinomen korreliert negativ mit dem Überleben der Patientinnen [Curiel 2004]. Auch die Produktion löslicher immunsuppressiver Faktoren durch Tumorzellen trägt zur deren Resistenz gegenüber der immunologisch vermittelten Tumorzelllyse bei. Regulatorische T-Zellen produzieren *transforming growth factor* (TGF) β und IL-10, die Tumorzellen selbst unter anderem den die Apoptose der betroffenen Zelle induzierenden Fas-Liganden und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) [Finn 2008]. VEGF ist in signifikanten Konzentrationen im Serum von Tumorpatienten nachweisbar [Kondo 1994]. Gabrilovich et al. konnten 1996 zeigen, dass der von den Tumorzellen produzierte VEGF die DC Ausreifung hemmt: Hier bietet sich zum einen eine Erklärung für eine Komponente der systemischen Immunsuppression bei Tumorpatienten, zum anderen auch ein Argument für die Tumorthherapie mit *ex vivo*, außerhalb des Einflusses löslicher immunsuppressiver Faktoren, generierten DC [Gabrilovich 1996].

Auch klinisch lassen sich Interaktionen zwischen Tumorzellen und dem Immunsystem beobachten. Sind Tumorantigene körpereigenen Strukturen ähnlich, so kommt es gelegentlich zu Autoimmunphänomenen. Eines der meistbeachteten ist die Entwicklung neurologischer Syndrome bei Patienten mit Mamma-, Ovarial- oder kleinzelligem Bronchialkarzinom [Darnell 2004, Banchereau 2000]. Zudem entwickeln immunsupprimierte Patienten häufiger Tumorerkrankungen [Dantal und Souillou 2005]. Die Bedeutung der Interaktionen zwischen dem Immunsystem und dem Tumor für das *outcome* der Patienten ist in den letzten Jahren deutlich geworden. Galon et al. konnten nachweisen, dass sich mittels Analyse der Immunzellen im Tumorsektat bei kolorektalem Karzinom eine genauere Prognose treffen lässt, als dies mit dem aktuell in Deutschland als Standard zur Klassifikation solider Tumore geltenden TNM-System möglich ist [Galon 2006].

1.3.2 Immunologisch basierte Tumorthherapie

Es existiert eine Vielzahl verschiedener Ansätze zur immunologisch basierten Tumorthherapie. Banchereau und Palucka schlugen 2005 eine Unterteilung in drei Gruppen vor die hier verwendet werden soll, um einen kurzen Überblick über die Möglichkeiten zu geben, das Wachstum maligner Tumore über Modifikationen des Immunsystems zu beeinflussen [Banchereau und Palucka 2005]:

- Die unspezifische Aktivierung des Immunsystems: Hierzu gehört zum Beispiel die Applikation von Adjuvantien direkt in den Tumor oder in seine Umgebung. Klinisch etabliert ist ein solches Verfahren zur Therapie des Blasenkarzinoms [Perabo und Müller 2004]. Die systemische Applikation von Zytokinen wie IL-12p70, IL-2 und TNF α hat sich ebenso wie die Infusion aktivierter NK-Zellen als sehr nebenwirkungsreich erwiesen [Blattman und Greenberg 2004, Pardoll 2002].
- Die zweite Möglichkeit besteht in der adoptiven Immuntherapie unter Verwendung spezifischer Antikörper oder *in vitro* generierter antigenspezifischer T-Zellen. Antikörper gegen HER2/neu gehören zur Standardtherapie des HER2/neu überexprimierenden Mammakarzinoms, ähnliches gilt für den Anti-CD20 Antikörper Rituximab, der in der Therapie von B-Zelllymphomen verwendet wird [Finn 2008, Blattman und Greenberg 2004]. Die Infusion antigenspezifischer, *in vitro* generierter und bzw. oder expandierter CD8⁺T-Zellen scheidet bislang an Schwierigkeiten, das Langzeitüberleben dieser Zellen zu sichern. In diesem Zusammenhang spielt unter anderem das Fehlen antigenspezifischer CD4⁺T-Zellen eine Rolle [Blattman und Greenberg 2004].
- Als Tumorstoffe werden Therapien bezeichnet, die spezifische Immunantworten gegen maligne Zellen induzieren. Neben der naheliegenden Immunisierung mit Tumorlysaten oder immunogenen Peptiden, die sich aufgrund der tumorinduzierten Immunsuppression als wenig effektiv erwiesen hat, kommen verschiedene Vektoren zum Einsatz [Rosenberg 2004]. Virale Vektoren werden aufgrund ihrer Fähigkeit zur IFN α Stimulation und Förderung der Kreuzprä-

sensation als vorteilhaft erachtet. Auch DC gelten aufgrund ihrer Funktion als Schaltzentrale des Immunsystems als geeignete Vektoren (S.16) [le Bon 2003].

Ein weiterer Ansatz, der in die obige Auflistung nicht eindeutig eingeordnet werden kann, ist die Deletion regulatorischer T-Zellen. Als Bestandteil einer Therapiekombination zur Durchbrechung immunologischer Toleranz wird er häufig diskutiert. Zudem gilt die Deletion regulatorischer T-Zellen als Erklärung für die auf den ersten Blick paradoxen synergistischen Effekte von Chemo- und Immuntherapien [Banchereau und Palucka 2005]. An Diphtherietoxin gekoppelte Antikörper die regulatorische T-Zellen eliminieren sind kommerziell erhältlich, in Deutschland jedoch noch nicht zur Therapie zugelassen [Zou 2005, Eklund und Kuzel 2005].

1.4 Tumorthherapie mit dendritischen Zellen

Im Gegensatz zur Impfung gegen einen infektiösen Erreger muss eine Tumorstoffimpfung einen weitaus komplexeren Eingriff in das Immunsystem bewerkstelligen: Die Toleranz gegenüber malignen Zellen muss durchbrochen und in eine effiziente Immunantwort umgewandelt werden [Gilboa 2007]. 1996 konnten Hsu et al. erstmals nachweisen, dass die Induktion einer Immunantwort gegen ein B-Zelllymphom mittels *in vitro* generierter DC möglich ist [Hsu 1996]. Nestle et al. zeigten kurze Zeit später die DC-vermittelte Induktion einer spezifischen Immunantwort bei Patienten mit fortgeschrittenem malignem Melanom [Nestle 1998]. Eine große Anzahl weiterer Phase I und Phase II Studien mit unterschiedlichen Ergebnissen folgte. Eine von Rosenberg et al. 2004 durchgeführte Metaanalyse erbrachte ein gegenüber viralen Vektoren und gegenüber den Peptidvakzinen etwa doppelt so hohes Ansprechen bei Verwendung von DC. In die Analyse ging aufgrund großer Unterschiede der Definition der Ergebniskriterien nur ein kleiner Teil der bis dato durchgeführten Studien ein [Rosenberg 2004].

Von Phan et al. wurden unter einer Peptidvakzine kombiniert mit einem Antikörper gegen das die fortlaufende T-Zell-Aktivierung inhibierende CD152 lebensbedrohliche Zwischenfälle beschrieben [Phan 2003]. Vergleichbare Vorfälle oder andere schwerwiegende unerwünschte Nebenwirkungen sind im Rahmen von DC-Vakzinestudien bislang nicht beobachtet worden. In einigen Fällen kam es zu lokalen Autoimmunphänomenen, etwa der Entwicklung einer Vitiligo unter Therapie mit mit Melanomantigenen gepulsten DC [Schuler 2003].

1.5 Generierung dendritischer Zellen *in vitro*

1.5.1 Anforderungen an für den Einsatz in der Tumorthherapie vorgesehene *in vitro* generierte dendritische Zellen

1.5.1.1 Ausreifung

Ein entscheidendes Merkmal zu tumortherapeutischen Zwecken geeigneter DC ist deren vollständige Ausreifung, da unreife DC Toleranz erzeugen (S.10) [Dhodapkar 2001, Jonuleit 2001].

1.5.1.2 Ausbeute und Migration

Morse et al. konnten zeigen, dass nur intrakutan, nicht aber subkutan oder intravenös injizierte DC in die drainierenden Lymphknoten gelangen und dort eine Immunantwort auslösen [Morse 1999]. Über den Prozentsatz der intrakutan injizierten DC, die den Lymphknoten erreichen, gibt es einige divergierende Angaben: Baratt-Boyes et al. fanden bei Rhesusaffen nur 0,1 % der Zellen, de Vries et al. im humanen Modell durchschnittlich 1,8 % der injizierten DC im drainierenden Lymphknoten [Baratt-Boyes 2000, de Vries 2003]. Eine mögliche Erklärung bieten hier die Untersuchungen von Martín-Fontecha et al., die im Mausmodell zeigen konnten, dass der

Prozentsatz der migrierten DC abhängig ist von der Anzahl der injizierten DC: Wurden 10^5 DC injiziert migrierten 0,01 %, die Injektion von $2 \cdot 10^6$ DC führte dazu, dass 3 % der DC in den Lymphknoten gelangten [Martín-Fontecha 2003]. Neben der Notwendigkeit, migrierende DC zu generieren scheint demzufolge auch die Ausbeute an reifen DC, entsprechend der Anzahl einsetzbarer Zellen, entscheidend zu sein.

1.5.1.3 Induktion einer Th1-gerichteten Immunantwort

Für eine effektive gegen maligne Tumore gerichtete Immunreaktion ist die Induktion einer Th1-gerichteten T-Zell-Antwort notwendig [Nishimura 2000]. Nur wenn Th1 gerichtete $CD4^+$ T-Zellen generiert werden ist auch die Entstehung von $CD8^+$ Gedächtniszellen und somit eine effektive Vakzinierung der Patienten möglich (S.7) [Banchereau und Palucka 2005]. Tatsumi et al. konnten zeigen, dass das Immunsystem von Tumorpatienten eine Th2-Wichtung aufweist [Tatsumi 2002]. Die Fähigkeit auch unter Th2-gewichteten Vorbedingungen Th1-Immunantworten zu induzieren gehört daher zu den Kernanforderungen an eine als Tumorstoff eingesetzte DC.

1.5.1.4 Robustheit

Eine multizentrische Phase-III-Studie zur Therapie des Malignen Melanoms wurde abgebrochen, da die Vakzinetherapie mit DC der Standardtherapie mit Dacarbazin nicht überlegen war. Die Autoren geben als einen der möglichen Gründe für das Scheitern der Studie an, dass es ihnen nicht gelungen war in den verschiedenen Zentren DC in ausreichender Anzahl und mit einem Ausreifungsgrad zu generieren, der den Vorgaben des Studienprotokolles entsprach [Schadendorf 2006]. Auf der anderen Seite veröffentlichten verschiedene Gruppen in den letzten Jahren Methoden, die den regelmäßigen Einsatz von DC für große Patientenzahlen ermöglichen sollen. In diesem Zusammenhang sind Versuche zur Kryokonservierung der DC ebenso zu nennen wie kommerziell erhältliche Methoden zur Separation von Monozyten [Schuler-Thurner 2002, Berger 2005]. Die Etablierung einer Methode zur Generie-

rung stabiler, problemlos auch in größeren Mengen reproduzierbarer DC zu Therapie Zwecken gewinnt vor diesem Hintergrund an Bedeutung.

1.5.2 Methoden zur *in vitro* Generierung dendritischer Zellen

Prinzipiell können DC *in vitro* sowohl aus CD34⁺ Vorläuferzellen als auch aus CD14⁺ Monozyten generiert werden. Auch die direkte Isolation von DC aus dem peripheren Blut ist möglich. Die Verwendung von Monozyten ist sowohl im Bereich der *in vitro* Forschung als auch im Rahmen klinischer Studien die vorherrschende Methode, da DC aus dem peripheren Blut und CD34⁺ Vorläuferzellen nicht ohne erheblichen Aufwand und nicht in größeren Mengen isoliert werden können [O'Neill 2004, Shortman und Liu 2002].

Bislang wurde ein Zweischnitt-Modell zur Erzeugung reifer DC aus Monozyten verwendet, das nach einer fünf- bis siebentägigen Differenzierungsphase eine zweitägige Ausreifung mit proinflammatorischen Zytokinen vorsah [Jonuleit 1997]. Die Verwendung der Kombination von IL-4 und *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) zur Differenzierung wurde 1994 von Sallusto und Lanzavecchia zum ersten Mal beschrieben und hat sich seitdem als Standardvorgehen mit gut reproduzierbaren Ergebnissen weitestgehend durchgesetzt [Sallusto und Lanzavecchia 1994, Rossi und Young 2005]. Die Methode gilt auch als Vorgehen der Wahl beim DC Einsatz im Rahmen klinischer Studien [Figdor 2004].

Grundlage des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Ausreifungsprotokolles sind Untersuchungen von Jonuleit et al., die einen Zytokincocktail aus TNF α , IL-1 β , PGE₂, und IL-6 als suffizient zur Ausreifung von DC beschrieben haben. Die Kombination gilt als eine Standardkombination für die Ausreifung monozytenabgeleiteter DC in klinischen Studien [Jonuleit 1997, Schuler 2003]. Die Verwendung von PGE₂ im Rahmen der Ausreifung von DC führt jedoch dazu, dass die so generierten DC nicht zu einer suffizienten IL-12p70 Produktion in der Lage sind [Kalinski 2001]. Wird auf die Verwendung von PGE₂ verzichtet, fehlt den DC die Fähigkeit zu

Migration [Legler 2006, Luft 2002]. Eine große Anzahl hiervon abweichender Protokolle wurde als Lösungsvorschlag für die oben erläuterte Problematik publiziert [Xu 2003, Mailliard 2004, Sakakibara 2006, Lehner 2008].

1.5.3 Das Modell der sequenziellen Stimulation

1998 konnten zwei Gruppen unabhängig voneinander nachweisen, dass CD40L die Th-Zelle bei der Induktion einer antigenspezifischen zytotoxischen T-Zelle ersetzen kann [Ridge 1998, Bennett 1998]. Snijders et al. identifizierten $\text{IFN}\gamma$ und CD40L als entscheidende Mediatoren zur Induktion der IL-12p70 Freisetzung antigenpräsentierender Zellen [Snijders 1998]. Vor diesem Hintergrund und aufbauend auf das bereits bekannte, CD40L-vermittelte verlängerte Überleben der DC wurde in unserer Arbeitsgruppe das Modell der sequenziellen Stimulation entwickelt [Caux 1994, Feuerstein 2000, Dauer 2006]. Abweichend vom zweizeitigen Modell der Differenzierung unreifer DC aus Monozyten und der darauffolgenden Ausreifung im Standardprotokoll zur Generierung von DC, wird ein als sequenzielle Stimulation bezeichneter dritter Stimulationsschritt unternommen: Unter Verwendung von $\text{IFN}\gamma$ und CD40L wird der Kontakt zur T-Zelle imitiert [Dauer 2006, Gilboa 2007].

1.5.4 Das *FastDC*-Konzept

Randolph et al. konnten beobachten, dass Monozyten beim Durchwandern eines Endothels innerhalb von zwei Tagen zu DC differenzieren, zudem entdeckten Radvanyi et al. in mit $\text{IFN}\alpha$, IL-4, GM-CSF und $\text{TNF}\alpha$ stimulierten Monozytenkulturen nach drei Tagen reife DC [Randolph 1998, Radvanyi 1999]. Diese Studien wiesen darauf hin, dass eine deutlich kürzere Zeitspanne als die bis dahin verwendeten fünf- bis sieben Tage ausreichend für die DC Generierung aus Monozyten ist. In unserer Arbeitsgruppe gelang es 2003 erstmals *FastDC* als innerhalb eines auf 48 Stunden verkürzten Zeitrahmens, im übrigen aber dem oben genannten Standardprotokoll entsprechend generierte DC zu erzeugen [Dauer 2003a]. *FastDC* sind kleiner und

dendritenärmer als konventionell generierte DC, bei vergleichbarer Expression der Reifemarker und kostimulatorischer Moleküle auf der Zelloberfläche. Die Ausbeute an DC pro eingesetzter Monozytenanzahl übertrifft jedoch diejenige der Standard-DC bei weitem [Dauer 2003a]. *FastDC* migrieren vergleichbar mit Standard-DC und sind letzteren bei der Induktion antigenspezifischer CD8⁺T-Zellantworten mindestens ebenbürtig [Dauer 2005].

In den letzten Jahren konnten verschiedene Gruppen das Konzept der *FastDC* bestätigen. Es kam – auch unter der Bezeichnung *RapidDC* – zunehmend sowohl im Rahmen von *in vitro* Studien, als auch zur Generierung von DC als Vakzine in klinischen Studien zum Einsatz [Alldawi 2005, Ramadan 2004, Tanaka 2006, Xu 2003, Alder 2006, Czerniecki 2007]. Jarnjak-Jankovic et al. verglichen *FastDC* unter den Voraussetzungen für einen routinemäßigen klinischen Einsatz – der maschinellen Monozytenseparation und darauffolgenden DC Generierung in geschlossenen Zellkultursystemen – mit Standard-DC: *FastDC* waren den Standard-DC gleichwertig [Jarnjak-Jankovic 2007].

1.6 Fragestellung

Eine für die Tumorthherapie geeignete DC muss in der Lage sein, die T-Zellzone des drainierenden Lymphknotens zu erreichen und dort eine stabile, Th1 gerichtete Immunantwort auszulösen. In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits nachgewiesen werden, dass *FastDC* nach Differenzierung mit GM-CSF/IL-4 plus $IFN\alpha$ und anschließender sequenzieller Stimulation mit $IL-1\beta/PGE_2/TNF\alpha$ und folgendem CD40L/ $IFN\gamma$ länger überleben und eine stabilere Ausreifung zeigen [Dauer 2006]. Im Rahmen dieser Arbeit sollten

- $IFN\alpha$ *FastDC* und *FastDC* bezüglich ihrer migratorischen Kapazität und der Fähigkeit zur Induktion einer $CD8^+$ T-Zellantwort verglichen und
- der Einfluss der sequenziellen Stimulation mit $IFN\gamma$ und CD40L auf die Migration und die Induktion einer $CD8^+$ T-Zellantwort durch $IFN\alpha$ *FastDC* und *FastDC* eruiert werden.

Vor dem Hintergrund der optimalen Induktion einer Th1-Antwort durch DC wurden vor kurzem von verschiedenen Gruppen Protokolle zur Ausreifung von DC vorgestellt, die die bis dahin noch nicht mögliche Kombination einer suffizienten IL-12p70 Sekretion mit erhaltener Migrationsfähigkeit der DC ermöglichen sollen [Mailliard 2004, Sakakibara 2006]. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte anhand eines ausgewählten Beispiels die

- Übertragbarkeit alternativer Ausreifungsprotokolle auf das *FastDC*-Modell und der Einfluss eines $IFN\alpha$ -*priming* der *FastDC* auf diese Protokolle überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Begasungsbrutschrank (BBD 6220)	Heraeus (München, D)
Eismaschine (AF200)	Scotsman Ice Systems (Vernon Hills, USA)
ELISA-reader (MRX)	Dynatech (Guernsey, UK)
FACS-Gerät (FACS Calibur)	BD Biosciences (Heidelberg, D)
<i>Gamma-Counter</i> (1480 Wizard3)	Wallac Oy (Turku, FIN)
<i>Laminar-Flow</i> (LaminAir ELB2448)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
MACS-Gerät (Vario-MACS)	Miltenyi Biotech (Auburn, USA)
Mikroskop (Diaphot TMD)	Nikon (Tokio, JP)
<i>Multistep</i> -Pipette (Multipette plus)	Eppendorf (Hamburg, D)
pH-Meter (CG822)	Schott (Mainz, D)
Pipetten (Eppendorf Reference)	Eppendorf (Hamburg, D)
Pipettus (Pipetus akku)	Hirschmann (Eberstadt, D)
UV-Lampe (TFL 20M)	MWG Biotech (Ebersberg, D)
Vortex	Janke und Kunkel (Staufen, D)
Zentrifuge (Omnifuge 2.0RS)	Heraeus (München, D)

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial aus Plastik (Kulturflaschen, Well-Platten, Pipettenspitzen, Zellschaber etc.) wurden von den Firmen Greiner (Frickenhäuser, D), Falcon (Heidelberg, D), Sarstedt (Nümbrecht, D), Eppendorf (Hamburg, D) und Zefa (München,

D) bezogen. Zusätzlich wurden an methodenspezifischen Verbrauchsmaterialien *LS-Separation Columns* von Miltenyi (Auburn, USA) und *Transwells* (6,5 mm Durchmesser; 5 μm pore size) von Corning Incorporated (Corning, USA) verwendet.

2.1.3 Reagenzien

2.1.3.1 Chemikalien

Bicoll	Biochrom (Berlin, D)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Brefeldin A	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth (Karlsruhe, D)
Fetales Kälberserum (FCS)	GibcoBRL (Paisley, UK)
Genticin G418-Sulfat	GibcoBRL (Paisley, UK)
Heparin-Natrium	Braun (Melsungen, D)
Humanes AB-Serum	Biowhittaker (Walkersville, USA)
Humanalbumin	Baxter (Lessines, B)
Ionomycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
L-Glutamin	PAA (Linz, A)
Monesin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
$\text{Na}_2 \text{}^{51}\text{CrO}_4$	Hartmann Analytic (Braunschweig, D)
NaCl 0,9 %	Baxter (Deerfield, USA)
NaOH	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
<i>phosphate-buffered saline</i> (PBS)	PAA (Linz, A)
Penicillin	PAA (Linz, A)
Pharm Lyse TM	Becton Dickinson (San Jose, USA)
pI:C	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Phorbol 12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Streptomycin	PAA (Linz, A)
TritonX	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)

Trypanblau	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
VLE-RPMI 1640	Biochrom (Berlin, D)

2.1.3.2 Puffer und Medien

MACS-Puffer: PBS
 2,68 mM EDTA
 0,5 vol% Humanalbumin

Der Puffer wurde mit NaOH auf einen pH zwischen 7,2 und 7,4 eingestellt.

CCR7-FACS-Puffer: PBS
 3 vol% FCS

Streptamer-FACS-Puffer: PBS
 0,5 vol% BSA

Erilysepuffer: 90 vol% Aqua dest.
 10 vol% Pharm LyseTM

Vollmedium: VLE-RPMI 1460
 2 vol% AB-Serum
 100 U/ml Penicillin
 100 µg/ml Streptomycin
 2 mM L-Glutamin

FCS-Medium: VLE-RPMI 1460
 10 vol% FCS
 100 U/ml Penicillin
 100 µg/ml Streptomycin
 2 mM L-Glutamin

Einfriermedium: 20 vol% VLE-RPMI 1460
 70 vol% FCS
 10 vol% DMSO

2.1.3.3 Zytokine und Chemokine

CCL21	Pepro-Tech Inc. (Rocky Hill, USA)
CD40L	Amgen (Thousand Oaks, USA)
GM-CSF	Novartis (Basel, CH)
IFN α	Strathmann Biotech (Hannover, D)
IFN γ	Strathmann Biotech (Hannover, D)
IL-1 β	Strathmann Biotech (Hannover, D)
IL-2	Strathmann Biotech (Hannover, D)
IL-4	Promega (Madison, USA)
IL-7	Strathmann Biotech (Hannover, D)
PGE ₂	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
TNF α	R&D Systems (Wiesbaden, D)

2.1.3.4 Peptide

Bezeichnung	Sequenz	Referenz
MART-1 _{26–35}	ELAGIGIL-TV	[Valmori 1998]
FLU-MA _{58–66}	GIL-GFVFTL	[Gotch 1987]
HIV-POL _{476–484}	IL-KEPVHGV	[Ogg 1998]

MART-1 und FLU-MA wurden von JPT Peptide Technologies (Berlin, D) bezogen. HIV-POL wurde an einem Gerät der GSF München synthetisiert (Peptide Synthesizer 433A, Applied Biosystems (Foster City, USA)).

2.1.3.5 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Floureszenzfarbstoff	Abkürzung
Allophycocyanin	APC
Fluorescein Isothiocyanate	FITC
Phycoerythricin	PE
Peridinin-Chlorophyll-A-Protein	PerCP

Spezifität-Floureszenz	Klon	Bezugsquelle	Isotyp
CD14-APC	M5E2	BD	mouse IgG _{2a} , κ
CD80-PE	L307.4	BD	mouse IgG ₁ , κ
CD83-FITC	HBI5e	BD	mouse IgG ₁ , κ
CD40-FITC	5C3	BD	mouse IgG ₁ , κ
CCR7-APC	150503	R&D Systems	mouse IgG _{2A}
CD3-FITC	UCHT1	BD	mouse IgG ₁ , κ
CD4-PE	RPA-T4	BD	mouse IgG ₁ , κ
CD8-APC	RPA-T8	BD	mouse IgG ₁ , κ
CD8-PerCP	SK1	BD	mouse IgG ₁ , κ
CD56-APC	B159	BD	mouse IgG ₁ , κ
CD107a-FITC	H4A3	BD	mouse IgG ₁ , κ
CD107b-FITC	H4B4	BD	mouse IgG ₁ , κ
HLA-A2-FITC	BB7.2	BD	mouse IgG _{2b} , κ
HLA-DR-PerCP	T39	BD	mouse IgG _{2a} , κ
HLA-A,B,C-FITC	G46-2.6	BD	mouse IgG ₁ , κ
IFN γ Alexa Fluor	B27	Caltag	mouse IgG ₁

2.1.3.6 Streptamere

MART-1 Streptamer IBA (Göttingen, D)

FLU-MA Streptamer IBA (Göttingen, D)

Beide Streptamere wurden mit Strep-Tactin-PE (IBA) gekoppelt.

2.1.3.7 Chemikaliensätze

ELISA

OptEIA TM Set Human IL-4	BD Biosciences (Heidelberg, D)
OptEIA TM Set Human IL-12(p70)	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Human IL-10 CytoSets TM	Biosource (Camarillo, USA)
Quantikine huIL-15 Immunoassay	R&D-Systems (Wiesbaden, D)
OptEIA TM Set Human IFN- γ	BD Biosciences (Heidelberg, D)

Andere Chemikaliensätze

Fix and Perm	Caltag Laboratories (Burlingame, USA)
Pan T Cell Isolation Kit II	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)

2.1.4 Zelllinien

2.1.4.1 T2-Zellen

T2 ist eine B-T-Lymphoblasten-Hybridzelllinie. Sie ist humanes Leukozyten-Antigen (HLA)-A2-positiv, die Zellen können mit entsprechenden Peptiden durch Zugabe der Peptide in das Kulturmedium beladen werden [Salter 1985]. T2-Zellen wurden von der *American Type Culture Collection* bezogen und in FCS-Medium in Kultur gehalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden T2-Zellen als *Target-Zellen* für *lysosomal-associated membrane glycoproteine (LAMP)*- und ⁵¹*Cr-release assays* eingesetzt. Die auf eine Konzentration von 10⁶ Zellen/ml Vollmedium eingestellten T2-Zellen wurden mit 10 μ M des jeweils gewünschten Peptides für vier Stunden bei 37 °C im Begasungsbrutschrank inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Vollmedium zur Entfernung von Peptidresten wurden die T2-Zellen erneut gezählt und dem jeweiligen Versuchsprotokoll entsprechend eingesetzt.

2.1.4.2 BHK-CD40L und BHK-pTCF

BHK-CD40L und BHK-pTCF sind Neomycin-resistente, mit CD40L beziehungsweise einer funktionslosen Kontrolle transfizierte Zelllinien. Beide wurden mit 200 μ g/ml Genticin G418-Sulfat in FCS-Medium in Kultur gehalten.

BHK-CD40L und BHK-pTCF wurden im Rahmen dieser Arbeit als Stimulatorzellen verwendet. Zur Inaktivierung diente eine UV-Bestrahlung mit 0,75 J/cm². Die so behandelten Zellen wurden sofort auf Eis gebracht, gezählt und umgehend im Verhältnis 1:10 (BHK:DC) zur DC-Stimulation verwendet. Beide Zelllinien stellte H. Engelmann (Institut für Immunologie der LMU) zur Verfügung.

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden der Zellkultur

2.2.1.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Alle verwendeten Zellen wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und unter 5 % CO₂ in der Atmosphäre in Kultur gehalten. Zur Sterilerhaltung der Kulturen wurden sämtliche Manipulationen unter einem *laminar air flow* durchgeführt.

2.2.1.2 Häufig durchgeführte Prozeduren

2.2.1.2.1 Ermittlung der Vitalität Zur Ermittlung der Vitalität wurden Zellen in 0,25 % iger Trypanblau-Lösung aufgenommen. Der Farbstoff gelangt nur bei toten Zellen ins Zytoplasma und ermöglicht so eine lichtmikroskopisch basierte Aussage über die Zellvitalität.

2.2.1.2.2 Ermittlung der Zellzahl Zur Ermittlung der Zellzahl wurden Zellen in geeigneter Verdünnung aufgenommen, zumeist erfolgte gleichzeitig die Bestimmung der Vitalität mittels Trypanblau. 10 μ l der Zellsuspension wurden in eine Neubauer Zählkammer gegeben und unter einem Lichtmikroskop ausgezählt.

2.2.1.2.3 Lyse kontaminierender Erythrozyten Pro ml der Zellsuspension wurden 4 ml Erylysepuffer zugegeben, nach gründlicher Vermischung der beiden Flüssigkeiten folgte dann eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach der Zugabe von 45 ml NaCl 0,9 % wurden die verbleibenden, kernhaltigen Zellen sofort zur weiteren Verwendung abzentrifugiert.

2.2.1.2.4 Zentrifugation Soweit nicht anders angegeben erfolgten Zentrifugationen bei 4 °C und 330 g für 10 Minuten.

2.2.1.3 Monozytenisolation

Gesunden freiwilligen Spendern wurde Vollblut entnommen. Je 100 ml Blut wurden mit 5000 IE Heparin antikoaguliert und im Verhältnis 1:1 mit isotoner Natriumchloridlösung vermischt. Anschließend erfolgte die manuelle Überschichtung von je 30 ml NaCl-Blut über 15 ml Bicol-*l*-Reagenz (einem Makromolekül mit einer Dichte von 1,077) mit nachfolgender 20-minütiger Gradientenzentrifugation bei 1000 g und Raumtemperatur. Die mononukleären Zellen konnten an der Grenze der schweren zur leichten Phase isoliert aufgenommen werden. Nach dreimaligem Dekantieren und Resuspendieren in isotoner Natriumchloridlösung zur Entfernung toxischer Bicol-*l*-Rückstände wurden die Zellen in 40 ml RPMI-Vollmedium wiederaufgenommen und für eine Stunde in zwei Kulturflaschen (175 cm²) liegend in den Brutschrank gegeben. Nichtadhärente Zellen konnten in der Folge durch zweimaliges Waschen mit je 15 ml PBS gerntet werden. Die adhärenen Zellen wurden wieder mit je 20 ml

Vollmedium pro Kulturflasche versorgt und am Folgetag mittels Cell-Scraper zur weiteren Verwendung gewonnen.

2.2.1.4 Generierung dendritischer Zellen

2.2.1.4.1 *FastDC* Monozyten wurden in einer Konzentration von $0,75 - 1,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in sechs-Well Platten mit 2 ml/Well RPMI-Vollmedium in Kultur gebracht. Für die ersten 24 Stunden wurden zur Generierung unreifer DC IL-4 (500 U/ml) und GM-CSF (1000 U/ml), sowie für ausgewählte Bedingungen IFN α (500 U/ml) eingesetzt. Darauf folgten für weitere 24-36 Stunden die Reifestimuli TNF α (1000 U/ml), IL-1 β (10 ng/ml) und PGE $_2$ (1 μ M). Die so generierten Zellen werden in der Folge als *FastDC* beziehungsweise *IFN α FastDC* bezeichnet [Dauer 2003a].

2.2.1.4.2 Unreife DC Zellen, bei denen auf die Induktion der Differenzierung kein Reifestimulus folgte, werden im Text als unreife DC bezeichnet.

2.2.1.4.3 Sequenziell stimulierte *FastDC* Die als sequenziell stimulierte *FastDC* bezeichneten Zellen wurden im Anschluss an eine zwölfstündige Reifeinduktion mit den oben genannten Zytokinen für weitere 24 Stunden mit zusätzlich zugegebenem IFN γ (1000 U/ml) und CD40L (500 ng/ml) stimuliert. Auch die sequenziell stimulierten *FastDC* wurden im Rahmen von Vergleichsversuchen teilweise mit IFN α zusätzlich zu GM-CSF und IL-4 differenziert.

2.2.1.4.4 *MigratoryFastDC* Für einige Versuche zur Migrationsfähigkeit reifer DC wurden Zellen in Anlehnung an ein publiziertes Migrationsprotokoll stimuliert [Schnurr 2003]. Für 24 Stunden mit oder ohne IFN α zusätzlich zu IL-4/GM-CSF generierte unreife DC wurden abweichend zu der bisherigen Standardstimulation mit deutlich höheren Zytokinkonzentrationen und unter Ersatz von IL-1 β durch IFN α stimuliert. Der Einsatz von PGE $_2$ (2,85 μ M) TNF α (1750 U/ml) und IFN α

(1000 U/ml) erfolgte in Anlehnung an das von Schnurr et al. publizierte Protokoll, die Zeiträume der Differenzierung (24h) und Ausreifung (36h) der eingesetzten DC entsprachen dem Vorgehen bei der Generierung von *FastDC*.

2.2.1.4.5 α type1DC und α type1FastDC Ein Teil der Versuche beschäftigt sich mit der Übertragbarkeit eines Protokolles von Mailliard et al. auf das 48-60 stündige *FastDC* Generierungssystem. Monozyten wurden wie oben beschrieben 24 Stunden mit IL-4/GM-CSF mit oder ohne IFN α Zugabe inkubiert. Anschließend folgte in Anlehnung an das publizierte Protokoll die Reifestimulation mit TNF α (1000 U/ml), IL-1 β (10 ng/ml), IFN γ (1000 U/ml) und pI:C (20 μ g/ml) [Mailliard 2004]. Die so generierten Zellen werden in der Folge als α type1FastDC bezeichnet.

2.2.1.5 Isolation von pan-T-Zellen

Pan-T-Zellen wurden mit Hilfe der *magnetic-activated cell sorting* (MACS)-Technik isoliert. Diese beruht auf der Markierung von Zellen mit biotinkoppelten Antikörpern gegen für die entsprechende Zellpopulation obligate Oberflächenantigene. An das Biotin werden anschließend paramagnetische Mikropartikel gebunden, die die Selektion mittels eines Magneten ermöglichen. Es besteht grundsätzlich sowohl die Möglichkeit einer positiven Selektion durch Markierung der interessierenden Zellen, Selektion im Magnetfeld und Ernte der Zellen mittels eines Stempels nach Entfernung des Magneten, als auch einer negativen Selektion durch Markierung aller nicht interessierenden Populationen.

Zur Isolation von pan-T-Zellen wurde das *Pan T cell Isolation Kit II* der Firma Miltenyi verwendet. Der Reagenziensatz enthält CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123 und Glycophorin A bindende Antikörper und dient der negativen Selektion humaner pan-T-Zellen. Die im Rahmen der Monozytenisolation anfallenden nichtadhärenten Zellen wurden mittels Erylysepuffer von kernlosen Zellen befreit, Zellklumpen wurden mit einem 40 μ m-pore Zellfilter entfernt. Die übrigen Zellen konnten

dann in MACS-Puffer aufgenommen, gemäß dem Protokoll des Herstellers markiert und die pan-T-Zellen negativ selektioniert werden. Nach mehrmaligem Waschen zur Entfernung des MACS-Puffers wurden die T-Zellen durchflusszytometrisch auf ihre Reinheit kontrolliert ($CD3^+$, $CD56^-$), anschließend mit 10 U/ml IL-2 zu $10\text{-}15\cdot 10^6$ Zellen/ml angesetzt und bis zur weiteren Verwendung wenige Tage im Brutschrank kultiviert.

2.2.1.6 Induktion antigenspezifischer T-Zellen

Zur Induktion antigenspezifischer T-Zellen wurde eine DC-pan-T-Zell Kokultur angelegt. Nachdem die verwendeten DC für die letzten vier Stunden der Reifeinduktion mit je 10 μM des entsprechenden Peptides (FLU-MA/ MART-1) gepulst worden waren wurden die DC geerntet, von Peptidüberständen befreit und auf eine Konzentration von $2\cdot 10^5$ /ml eingestellt. Die autologen pan-T-Zellen wurden aus den Kulturflaschen entnommen, von Mediumrückständen befreit und in einer Konzentration von $2\cdot 10^6$ /ml in frischem Vollmedium aufgenommen. Je 1,5 ml der Zellsuspensionen wurden in einer 12-Well Platte zusammengegeben. Zugewetzt wurden IL-2 (25 U/ml) und IL-7 (10 ng/ml).

Am Tag 8 und 15 nach Ansatz der Kokultur wurden vorsichtig 1,5 ml Medium vom oberen Rand des Wells entnommen und die Kokultur mit identischen Mengen autologer, frisch generierter DC restimuliert. Die Abnahme von Zellüberstand für *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) erfolgte jeweils 48 Stunden nach Ansatz beziehungsweise Restimulation der Kokultur, des Weiteren wurde 48-stündlich 50 % des Mediums wie oben beschrieben abgenommen und durch frisches, identisch zytokinangereichertes Vollmedium ersetzt. Der zeitliche Verlauf ist in Abb. 2.1 dargestellt.

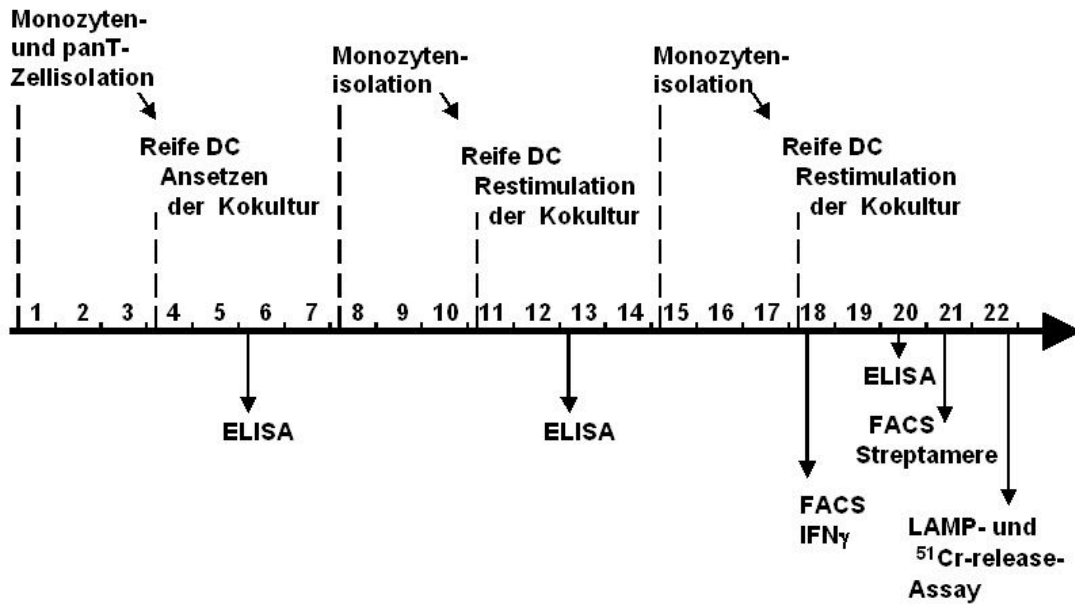


Abbildung 2.1: Zeitlicher Verlauf eines Versuchsansatzes zur Induktion antigenspezifischer CD8⁺T-Zellen.

2.2.2 Analyseverfahren

2.2.2.1 Durchflusszytometrie

Im Rahmen der *fluorescence-activated cell sorting* (FACS)-Analyse können Aussagen über Größe und Granularität sowie über die Expression verschiedener intra- oder extrazellulärer Moleküle getroffen werden.

Das Funktionsprinzip der Methode beruht auf einem laminaren Strom aus Trägerflüssigkeit und Probenmaterial, der durch ein Lasersystem geführt wird. Aussagen über die Größe der Zellen können mittels eines die Vorwärtsstreuung ermittelnden Detektors getroffen werden, die Granularität wird aus dem im rechten Winkel abgelenkten Seitwärtsstreulicht berechnet. Aus diesen Daten kann dann bereits eine

Auswahl der relevanten Zellen getroffen werden, da verschiedene Populationen charakteristische Größen/Granularitätsverhältnisse aufweisen.

Zur weiteren Analyse werden Fluorochrom-gekoppelte Antikörper gegen das interessierende Antigen verwendet. Das Chromophor des Farbstoffes wird durch den Laserstrahl des Gerätes zur Emission von Licht einer anderen Wellenlänge angeregt, welches mittels verschiedener Linsen aufgetrennt und im Gerät detektiert wird. Die Fluoreszenzintensität ist proportional zur Zahl der gebundenen Fluorochrome, so dass eine Aussage über die relative Stärke der Expression getroffen werden kann.

Da sich die Emissionsspektren der verwendeten Farbstoffe teilweise überschneiden sind Kompensationen notwendig. Hierbei wird die mögliche Überstrahlung eines Farbstoffes in benachbarte, einem anderen Fluorochrom zugeordnete Frequenzbereiche anhand von Einzelfärbungen ermittelt und entsprechend subtrahiert. Um zudem die unspezifische Hintergrund-Fluoreszenz subtrahieren zu können wird eine Isotyp-Färbung mittels an die zu untersuchende Zellpopulation nicht bindenden, im übrigen aber vergleichbaren Antikörpern notwendig. Zur Erzeugung eines Isotypen wurden die verschiedenen zu analysierenden Zellpopulationen zu gleichen Teilen in ein Probenröhrchen gegeben und mit den oben angegebenen Isotyp-Antikörpern entsprechend dem bei den Proben verwendeten Vorgehen markiert.

2.2.2.1.1 Bestimmung von Oberflächenmarkern Zur Bestimmung der Oberflächenmarker wurden $10^5 - 10^6$ Zellen in $150 \mu\text{l}$ PBS aufgenommen und mit $3 \mu\text{l}$ des fluoreszenzgekoppelten Antikörpers versetzt. Die Inkubation erfolgte für 20 Minuten bei 4°C unter Lichtausschluss. War eine Kompensation erforderlich wurden Einzelfärbungen hergestellt. Nach Entfernung der nichtgebundenen Antikörperreste mittels Zugabe von 3 ml PBS, gefolgt von Abzentrifugation und Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in $200 \mu\text{l}$ PBS resuspendiert und bei kontinuierlicher Kühlung auf 4°C direkt im Anschluss analysiert.

2.2.2.1.2 Identifizierung HLA-A2 positiver Probanden Aus etwa einem Milliliter Vollblut wurden mittels Erythrozytenlyse die kernhaltigen Zellen isoliert und mit einem FITC konjugierten Antikörper wie oben beschrieben angefärbt.

2.2.2.1.3 Markierung des Chemokinrezeptors CCR7 Für die Markierung des Chemokinrezeptors CCR7 wurden die DC vor Zugabe des Antikörpers 15 Minuten bei Raumtemperatur mit CCR7-FACS Puffer vorinkubiert und danach mit 5 μl CCR7-APC analog dem oben beschriebenen Vorgehen markiert. Die 45-minütige Inkubation bei 4 °C erfolgte ebenso wie die Färbung in CCR7-FACS Puffer.

2.2.2.1.4 Bestimmung der intrazellulären Interferon-gamma-Konzentration

Um die Zytokinproduktion verschiedener T-Zell-Populationen zu messen ist eine Stimulation der Zellen erforderlich. Anschließend muß die Zelle fixiert und permeabilisiert werden, um den Antikörpern Zugang zu den intrazellulär vorliegenden Zytokinen zu verschaffen. Um eine Sekretion von Zytokinen zu verhindern und die nachweisbaren Zytokine intrazellulär zu augmentieren wird Brefeldin A als Sekretionsinhibitor eingesetzt [Jung 1993, Picker 1995].

Die Bestimmung der intrazellulären IFN γ Konzentration wurde im Rahmen einer Restimulation bereits vorstimulierter T-Zellen durchgeführt. $5 \cdot 10^4$ frisch generierte DC und $5 \cdot 10^5$ T-Zellen der Kokultur wurden in insgesamt 250 μl Vollmedium in ein steriles 4 ml-Gefäß aufgenommen. Zu den Maximalkontrollen und der Kompensation für ALEXA-FITC wurden Ionomycin (500 ng/ml) und PMA (50 ng/ml) als zusätzliche Sekretionsstimulatoren zugefügt, um die grundsätzliche Funktionsfähigkeit des *assays* nachzuweisen. Zudem wird durch dieses Vorgehen eine zuverlässige Kompensation sich überschneidender Emissionsspektren ermöglicht. Nach den ersten zwei Stunden der insgesamt sechsstündigen Inkubation im Begasungsbrutschrank erfolgte die Zugabe des Sekretionsinhibitors Brefeldin A (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Anschließend wurden CD3, CD4 und CD8 dem oben beschriebenen Protokoll entsprechend zur Markierung von Oberflächenmolekülen angefärbt. Fixation und Permeabilisation erfolgten

dem Herstellerprotokoll entsprechend mit *Fix and Perm* Reagenz, der $\text{IFN}\gamma$ Antikörper wurde im Rahmen der Permeabilisation im Verhältnis 1:100 zugeführt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und zweimaligem Waschen mit 3 ml PBS wurde die Messung direkt im Anschluss durchgeführt.

2.2.2.1.5 MHC I-Multimer-Färbungen MHC I-Multimere sind Komplexe aus Peptid und passendem MHC I, die an ein Fluorochrom gekoppelt sind. Irreversibel gekoppelte Komplexe werden als Tetramere bezeichnet, Streptamere weisen eine reversible Kopplung auf. Letztere werden mittels Strep-tag an einen Strep-Tactin-PE Komplex gebunden und so mit PE gekoppelt und gleichzeitig polymerisiert. Auf diese Weise können T-Zellen identifiziert werden, die einen antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR) tragen. Da eine einzelne TCR-Peptid-MHC-Bindung keine ausreichende Bindungsaffinität aufweist ist die Polymerisation zur Kopplung mit einem Fluorochrom notwendig (Abb: 2.2) [Altman 1996]. Die Verwendung des Strep-tag-Strep-Tactin-Bindungssystems ermöglicht eine Lösung dieser Bindung durch Biotin, die MHC I-Peptid-Komplexe diffundieren dann ab und die Färbung wird reversibel [Knabel 2002]. Von letzterer Möglichkeit wurde im Rahmen dieser Arbeit kein Gebrauch gemacht, Streptamere dienten ausschließlich dem Nachweis antigenspezifischer T-Zellen.

Für jede Probe wurden $0,75 \mu\text{g}$ Strep-Tactin-PE mit $1 \mu\text{g}$ MHC in $45 \mu\text{l}$ Streptamer-FACS-Puffer 45 Minuten bei 4°C und Dunkelheit vorinkubiert. Im Anschluss wurden 10^5 T-Zellen in $100 \mu\text{l}$ Puffer aufgenommen und mit den Streptameren 45 Minuten unter Lichtausschluss auf Eis inkubiert. Als Isotyp diente ein MHC -Multimerfreier Ansatz, der ansonsten analog behandelt wurde. Nach den ersten 25 Minuten der Inkubation wurde zusätzlich entsprechend dem auf S. 35 zur Markierung von Oberflächenmarkern beschriebenen Protokoll CD8-APC zugefügt. Nach zweimaligem Waschen mit Streptamer-FACS-Puffer bei 4°C wurden die Zellen im direkten Anschluss analysiert.

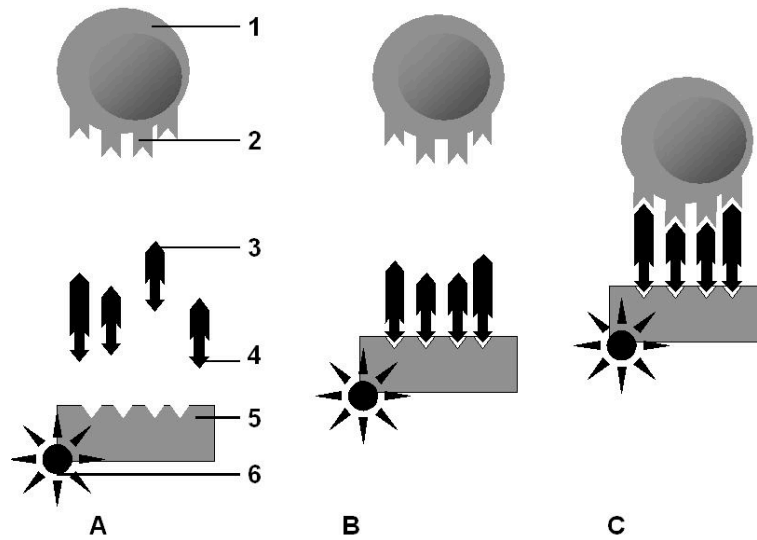


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Markierung antigenspezifischer T-Zellen (1) mit Streptameren. Der den MHC-Antigen-Komplex imitierende Teil des Komplexes (3) ist an Strep-tag (4) gekoppelt und bindet an den T-Zell-Rezeptor (2). Da diese Bindung allein nicht stabil ist, wird der Komplex mittels Strep-tactin (5) polymerisiert und gleichzeitig an ein Fluorochrom (6) gekoppelt. A: Initialzustand B: Nach Vorinkubation von Strep-tag und Strep-tactin-PE C: Streptamer-Färbung.

2.2.2.1.6 LAMP-assay Der Nachweis degranulierender, zytotoxischer T-Zellen erfolgte mittels *LAMP-assay*. Dieser ermöglicht den direkten Nachweis degranulierender Zellen zusammen mit einer Charakterisierung dieser Zellen anhand von Oberflächen- oder intrazellulären Markern in der Durchflusszytometrie [Betts 2003]. Die Methode basiert auf der kurzzeitigen Oberflächenpräsenz von CD107a und CD107b während der Degranulation. Im Zytoplasma zytotoxischer T-Zellen und NK-Zellen befinden sich präformierte lytische Granula, die unter anderem Perforin und Granzyme enthalten. CD107a und CD107b gehören zu den LAMP-Glycoproteinen, die die Innenmembran der lytischen Granula auskleiden und deren Funktion im einzelnen noch nicht eindeutig geklärt ist [Trapani und Smyth 2002]. Beide Glycoproteine sind im Rahmen der Degranulation der Zelle für kurze Zeit an der Zelloberfläche nachweisbar und können zu diesem Zeitpunkt zum Degranulationsnachweis mit ei-

nem Antikörper markiert und im Anschluss durchflusszytometrisch erfasst werden (Abb: 2.3).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein *LAMP-assay* zur quantitativen Bestimmung der peptidspezifischen zytotoxischen T-Zellen eingesetzt. Den Effektorzellen wurden peptidgepulste T2-Zellen als *Target-Zellen* angeboten [Mittendorf 2005]. Auf eine 96-Well-Platte wurden je $1 \cdot 10^5$, $2 \cdot 10^5$ und $4 \cdot 10^5$ Effektorzellen in $50 \mu\text{l}$ Vollmedium vorgelegt. Nach der Zugabe von jeweils $2,5 \mu\text{l}$ eines CD107a/CD107b Antikörpers wurden $1 \cdot 10^4$ T2 Zellen – ebenfalls in $50 \mu\text{l}$ Vollmedium – ergänzt, so dass Effektor-*target-ratios* von 40:1, 20:1 und 10:1 entstanden. Nach der ersten Stunde der insgesamt sechsständigen Inkubation bei 37°C erfolgte die Zugabe von Brefeldin A ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) oder Monesin ($10 \mu\text{M}$). Nach dem Ende der Inkubationszeit wurde eine Markierung des Oberflächenantigens CD8 wie auf S. 35 beschrieben durchgeführt und die Zellen unter kontinuierlicher Kühlung auf 4°C direkt im Anschluss analysiert. Alle Ansätze und Analysen erfolgten in Triplikaten. Als Negativkontrollen wurden sowohl Bedingungen ohne Zugabe von *Target-Zellen* als auch solche ohne Zugabe von Effektorzellen verwendet. Zusätzlich kamen mit irrelevanten Peptiden gepulste *Target-Zellen* zum Einsatz.

2.2.2.2 Migration

Zur Überprüfung der Migrationsfähigkeit reifer DC wurden diese auf $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml Medium eingestellt. Je $2 \cdot 10^4$ DC ($100 \mu\text{l}$) wurden in ein Transwell gegeben, welches dann auf $600 \mu\text{l}$ Vollmedium mit $100 \text{ ng}/\text{ml}$ CCL21 in einer 24 well-Platte aufgesetzt werden konnte (Abb: 2.4). Als Kontrolle diente Vollmedium ohne Zusatz von Chemokinen, die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurden die Transwells entfernt ohne ihren Inhalt in die Well-Platten gelangen zu lassen. Der Inhalt der Well-Platten wurde dann in ein 1ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 400 g abzentrifugiert. Nach Reduktion des Volumens auf $50 \mu\text{l}$ durch Abpipettieren des entsprechenden Überstandvolumens konnte eine manuelle Auszählung der Zellen mittels Neubauer-Zählkammer erfolgen.

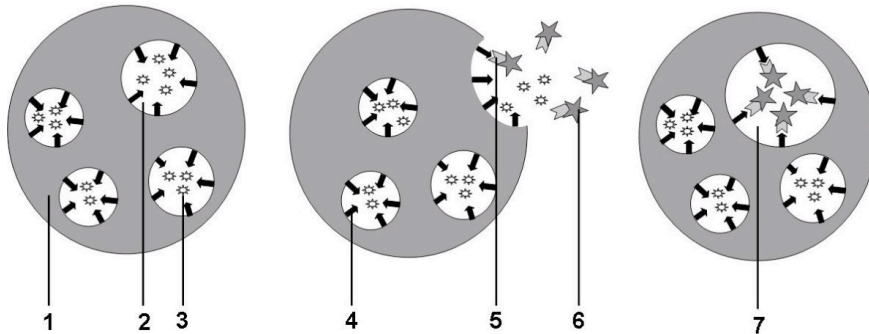


Abbildung 2.3: Funktionsprinzip des *LAMP-assays*. Zytotoxische T-Zellen (1) besitzen unter anderem mit Granzymen und Perforinen (3) gefüllte Granula (2). Bei einer Degranulation werden letztere entleert und CD107a/b (4) gerät für kurze Zeit an die Zelloberfläche, wo fluoreszenzgekoppelte Antikörper (5,6) binden können. Die in der Folge wieder intrazellulär (7) vorhandenen Fluorochrome (6) können via FACS nachgewiesen werden.

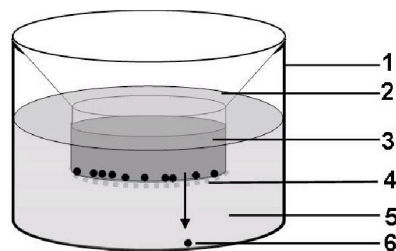


Abbildung 2.4: Versuche zur Migration von DC wurden mit Hilfe von Transwells durchgeführt. In ein Well einer 24 Well-Platte (1) wird das Transwell bestehend aus einem Haltetrichter (2) einer mit DC gefüllten Kammer (3) und einer Membran mit 5 µm Porengröße und 6,5 mm Durchmesser (4) eingesetzt. In dem Well befindet sich mit einem Chemokin versetztes Vollmedium (5). Hier können nach Ablauf des Versuches die durch die Membran migrierten Zellen (6) nachgewiesen werden.

2.2.2.3 ^{51}Cr -release assay

Der ^{51}Cr -release assay quantifiziert die Lyse vorher markierter Zellen, er wird zum indirekten Nachweis zytotoxischer T- oder NK-Zellen eingesetzt. Den Zielzellen wird sechswertiges Chrom angeboten, welches diese aufnehmen und in der Zelle zu dreiwertigem Chrom reduzieren. Dreiwertiges Chrom kann weder eine intakte Zelle verlassen, noch von einer solchen aufgenommen werden. Nach der Inkubation zur Chromaufnahme werden die Zielzellen mehrmals gewaschen, so dass später im Zellüberstand auftretende Radioaktivität zum quantitativen Nachweis lysierter Zielzellen eingesetzt werden kann. Aus der Menge des freigesetzten Chroms kann mithilfe folgender Formel die spezifische Lyse berechnet werden:

$$\% \text{spezifische Lyse} = \frac{(\text{experimentelle } ^{51}\text{Cr Freisetzung}) \cdot (\text{spontane } ^{51}\text{Cr Freisetzung})}{(\text{maximale } ^{51}\text{Cr Freisetzung}) \cdot (\text{spontane } ^{51}\text{Cr Freisetzung})}$$

10^6 in der Folge als *Target*-Zellen bezeichnete T2-Zellen, die vorher für vier Stunden mit $10 \mu\text{M}$ FLU-MA, MART-1 oder HIV-POL gepulst worden waren wurden in $100 \mu\text{l}$ $\text{CiNa}_2^{51}\text{CrO}_4$ aufgenommen und für eine Stunde bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Darauf folgten drei Waschschriffe zur Entfernung von Chromrückständen im Überstand. Die *Target*-Zellen wurden erneut gezählt und auf eine Konzentration von $5 \cdot 10^4$ Zellen/ml eingestellt. Effektorzellen wurden dem gewünschten Effektor-*target*-Verhältnis entsprechend in $100 \mu\text{l}$ Vollmedium auf eine 96-Well-Platte vorgelegt und die *Target*-Zellen ebenfalls in $100 \mu\text{l}$ zu einem Gesamtvolumen von $200 \mu\text{l}$ /Well ergänzt. Nach vierstündiger Inkubation bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ wurden zellulose Mediumüberstände abgenommen und die Radioaktivität mittels eines *Gamma-counters* bestimmt. Alle Messwerte wurden in Triplikaten erhoben. Als Äquivalent der maximalen Lyse dienten mit einer 1 %igen Lösung des Detergens TritonX behandelte T2-Zellen. Die Spontanlyse wurde durch Zugabe von effektorzelllosem Vollmedium an Stelle der Effektorzellen ermittelt. ^{51}Cr -release assays wurden in Kooperation mit Prof. Wank (Institut für Immunologie, LMU) durchgeführt.

2.2.2.4 Enzyme linked immunosorbent assay

Zur Messung von Proteinkonzentrationen in Mediumüberständen wurden ELISA-Reagenziensätze verwendet. Diese beruhen auf dem sogenannten Sandwich-Prinzip eines übereinandergeschichteten Antikörper-Antigen-Antikörper-Nachweismittel Stapels.

Der Boden einer 96-Well-ELISA Platte wurde mit einem *Coating*-Antikörper gegen das nachzuweisende Protein beschichtet. Nachdem Reste des Antikörpers gründlich ausgewaschen worden waren, wurde die Probe in geeigneter Verdünnung aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit wurde wiederum gewaschen, und eine *Capture*-Antikörper-Biotin Verbindung aufgetragen, die nach erneuter Inkubation und einem weiteren Waschschrift an Streptavidin-Peroxidase gebunden wurde. Freie Überreste der Peroxidase wurden entfernt und ein Substrat, das einen Farbumschlag erzeugt zugegeben. Anhand der Intensität des Farbumschlages, die mit einem ELISA-Reader ermittelt wurde, konnte unter Zuhilfenahme einer Standardverdünnungsreihe die spezifische Proteinkonzentration der einzelnen Proben berechnet werden.

Zur Zytokinkonzentrationsmessung mittels ELISA wurden zu verschiedenen Zeitpunkten zellfreie Überstände aus dem Kulturmedium gewonnen und bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Inkubationszeiten, Puffer und die Anzahl der Waschschrift varierten zwischen den verschiedenen Reagenziensätzen, es wurden jeweils die Anweisungen der Hersteller befolgt. Der Quantikine huIL-15 Immunoassay enthielt mit einem Coating-Antikörper vorbeschichtete Platten.

2.2.3 Statistik und Software

Fehlerbalken geben den *standard error of the mean* (SEM) an. Für weitere statistische Berechnungen wurde der zweiseitige, gepaarte Student t -Test verwendet. Statistische Signifikanz wird ab einem $p \leq 0,05$ angenommen. Signifikanzen sind mit Asterisken markiert:

- * $p \leq 0,05$
- ** $p \leq 0,01$
- *** $p \leq 0,001$

Für sämtliche statistischen Berechnungen sowie die Erstellung von Diagrammen wurde das Programm Microsoft Exel 2000 verwendet, Schemazeichnungen wurden mit Microsoft Power Point 2000 erstellt. Erhebung und Verarbeitung der FACS-Daten erfolgte unter Verwendung der CellQuest Software (Version 3.2.1) der Firma BD Biosciences (Heidelberg, D). Zur Textverarbeitung diente $\text{\LaTeX} 2_{\epsilon}$.

-

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Interferon-alpha auf die Generierung von *FastDC*

In unserer Arbeitsgruppe konnte im Vorfeld dieser Arbeit gezeigt werden, dass innerhalb von 48 Stunden generierte DC, die nach erfolgter Ausreifung in zytokinfreies Medium transferiert wurden ihre Oberflächenmarker stabiler exprimierten und länger überlebten, wenn zu Beginn der Differenzierung zusätzlich zu IL-4 und GM-CSF $IFN\alpha$ zugegeben wurde. Der Effekt ließ sich durch eine sequenzielle Stimulation mit $IFN\gamma$ und CD40L in den letzten 24 Stunden der Reifung nach vorangegangener zwölfstündiger Reifeinduktion mit $PGE_2/TNF\alpha/IL-1\beta$ noch steigern [Dauer 2006].

Ziel der nachfolgend beschriebenen Experimente war die weitere Charakterisierung der *IFN α -geprimten FastDC*. Neben der Überprüfung der migratorischen Funktion und der Ermittlung des Zytokinproduktionsmusters wurde die peptidspezifische Aktivierung autologer naiver T-Zellen durch *FastDC* ermittelt.

3.1.1 Migration

3.1.1.1 Migration von *FastDC* im Vergleich mit *IFN α FastDC*

Für den Vergleich von *IFN α -geprimten* mit konventionell zur Differenzierung gebrachten *FastDC* wurden *migratoryFastDC* verwendet. Zusätzlich zur Migration auf das Chemokin CCL21 erfolgte die durchflusszytometrische Messung des Chemokinrezeptors CCR7.

Die CCR7-Expression der zur Migration verwendeten reifen *FastDC* korrelierte mit der Migrationsrate. CCR7 konnte auf etwa 50 % der Zellen nachgewiesen werden, ohne Unterschied zwischen *migratoryFastDC* und *migratory-IFN α FastDC*. 25-30 % der unreifen *FastDC* exprimierten CCR7 (Abb: 3.1A). Wie erwartet migrierten unreife DC bei Verwendung von CCL21 nicht.

Die Migrationsfähigkeit reifer DC war unabhängig vom IFN α -priming. Der Anteil an innerhalb von zwei Stunden durch die Membran migrierten DC betrug für beide Populationen 55 %. Weniger als 4 % der ohne CCR7 im Zielmedium inkubierten DC wanderte spontan durch die Membran (Abb: 3.1B).

3.1.1.2 Der Einfluss der sequenziellen Stimulation auf die Migration von *FastDC* und *IFN α FastDC*

In einem weiteren Experiment wurde die Migrationsfähigkeit von *FastDC* mit der von sequenziell stimulierten *FastDC* verglichen. Für die sequenzielle Stimulation wurden mit IFN α *geprimte* und *ungeprimte FastDC* verwendet. Die Zellpopulationen erreichten eine vergleichbare Migrationsrate von etwa 45 %, ohne Chemokineinsatz waren 5-10 % der eingesetzten Zellen spontan migriert. Wurde PGE₂ aus dem Stimulationscocktail entfernt, migrierten die Zellen nicht (Abb: 3.2).

3.1.2 Zytokinproduktion der untersuchten *FastDC*-Populationen

Zur Untersuchung der Zytokinproduktion von *FastDC* und *IFN α FastDC* wurden zellfreie Mediumüberstände nach Abschluss der Ausreifung der DC sichergestellt.

IL-15 konnte weder im Kulturmedium von IFN α *geprimten*, noch im Medium von *ungeprimten FastDC* nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Zur Überprüfung der IL-12p70 Produktion wurden die reifen *FastDC* gewaschen und für weitere 24 Stunden mit CD40L-exprimierenden, UV-inaktivierten BHK-PTCF-CD40L Zellen

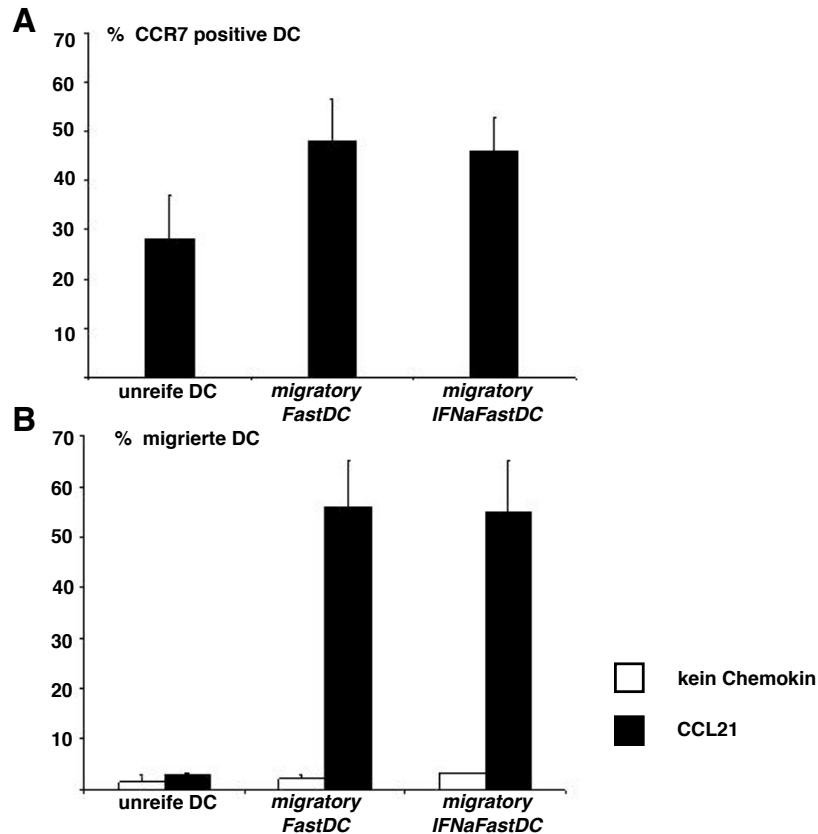


Abbildung 3.1: CCR7 wird verstärkt auf reifen, aber auch auf unreifen DC exprimiert. Nur reife DC migrieren auf CCL21. *IFNα-priming* hat keinen Einfluss auf die CCR7 Expression und Migration von *FastDC*. A: CCR7 Expression in %, die DC wurden den jeweiligen Protokollen gemäß generiert und nach Abschluss der Ausreifung mittels FACS analysiert. B: migrierte Zellen in % der insgesamt eingesetzten Population. Die Zellen wurden in ein Transwell eingesetzt, die Anzahl der migrierten DC wurde nach zwei Stunden ermittelt. Mittelwerte der Daten von drei Experimenten sind dargestellt, der Fehlerbalken beschreibt die Standardabweichung der Mittelwerte.

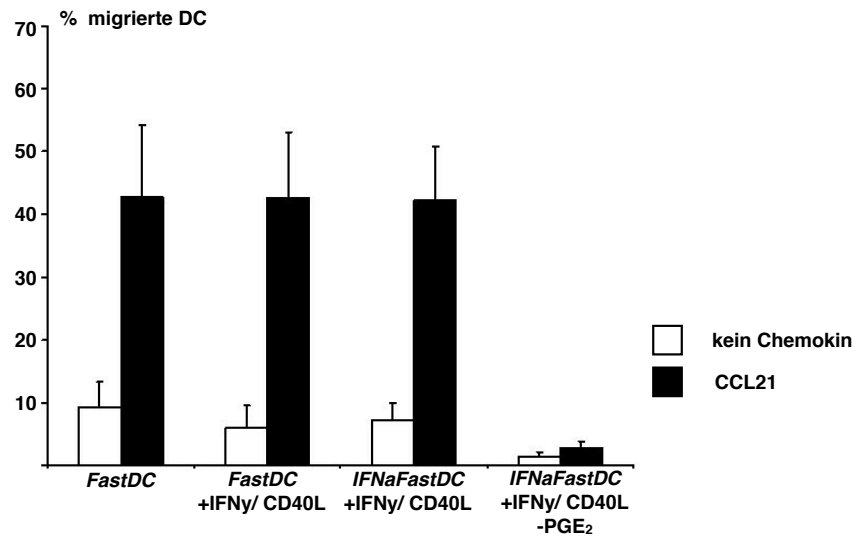


Abbildung 3.2: Die sequenzielle Stimulation mit IFN γ und CD40L hat keinen Einfluss auf die CCR7-abhängige Migration von *FastDC*. Auch die Migration sequenziell stimulierter DC ist PGE $_2$ abhängig. Die Zellen wurden in ein Transwell eingesetzt, die Anzahl der migrierten DC wurde nach zwei Stunden ermittelt. Mittelwerte der Daten von vier Experimenten sind dargestellt, der Fehlerbalken beschreibt die Standardabweichung der Mittelwerte.

inkubiert. Die Analyse des vor- und nach der Inkubation sichergestellten Zellüberstandes erfolgte mittels ELISA. Es konnte keine IL-12p70 Produktion im nachweisbaren Bereich ($\geq 7,8 \text{ pg/ml}$) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.1.3 Induktion einer peptidspezifischen CD8 $^+$ T-Zellantwort durch *FastDC* und IFN α *FastDC* unter dem Einfluss einer sequenziellen Stimulation

Um die Fähigkeit von DC zur Induktion von autologen zytotoxischen-T-Zellen zu überprüfen wurde ein auf einer autologen Kokultur von DC und pan-T-Zellen beruhender Versuchsaufbau verwendet. Als Modellantigene dienten MART-1 und FLU-MA. Um die Frequenz antigenspezifischer CD8 $^+$ T-Zellen zu messen wurden verschiedene Methoden angewendet. Streptamere ermöglichen den direkten durchfluss-

zytometrischen Nachweis antigenspezifischer T-Zellen. Mithilfe einer intrazellulären Fluoreszenzfärbung konnte die Frequenz der IFN γ -produzierenden T-Zellen ermittelt werden. Zusätzlich wurde im Rahmen einiger Experimente die Bestimmung des IFN γ -Gehaltes im Zellüberstand eingesetzt. Zum Nachweis der spezifischen Lyse wurden T2-Zellen, mit dem entsprechenden Modellantigen oder einem irrelevanten Peptid gepulst, als Zielzellen eingesetzt. Die Messung der lytischen Aktivität erfolgte dann mittels ^{51}Cr -*release assay*. Parallel dazu wurden Messungen mit dem auf Effektorzelldegranulation basierenden *LAMP-assay* durchgeführt.

3.1.3.1 Expression des antigenspezifischen T-Zell-Rezeptors

Vier Tage nach der zweiten Restimulation der pan-T-Zell/DC- Kokultur wurde ein Aliquot der Zellen entnommen. Zur Bestimmung der Frequenz MART-1 beziehungsweise FLU-MA spezifischer CD8⁺T-Zellen wurde eine Streptamer-Färbung verwendet. Für FLU-MA konnte kein Unterschied der Frequenz antigenspezifischer CD8⁺T-Zellen zwischen mit *FastDC* oder mit *IFN α FastDC* stimulierten Kokulturen nachgewiesen werden. Beide Populationen erreichten etwa 5 % Streptamer-positive Zellen. Die Verwendung von MART-1 in einem identischen Versuchsansatz führte mit 15-25 % zu insgesamt höheren Raten Streptamer-positiver CD8⁺T-Zellen, wobei interindividuell größere Schwankungen auftraten. Zwar zeichnete sich bei mit *IFN α FastDC* stimulierten Kokulturen die Tendenz zu einer gesteigerten Induktion MART-1 spezifischer CD8⁺T-Zellen ab, der Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (Abb: 3.3).

Der Vergleich zwischen *FastDC* und sequenziell stimulierten *FastDC* sowie sequenziell stimulierten *IFN α FastDC* wurde mit MART-1 als Modellpeptid durchgeführt. Bezüglich der Frequenz peptidspezifischer CD8⁺T-Zellen ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den mit verschiedenen DC-Populationen stimulierten pan-T-Zellen. Alle drei Populationen erreichten im Mittelwert Frequenzen zwischen 16,5 % und 17,5 % peptidspezifischer CD8⁺T-Zellen (Abb: 3.4).

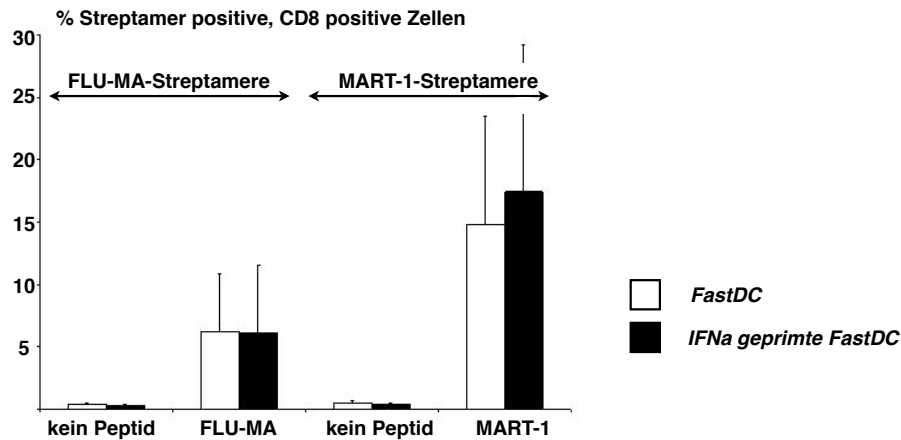


Abbildung 3.3: $IFN\alpha$ -priming von *FastDC* hat keinen Einfluss auf die Induktion FLU-MA $CD8^+$ -T-Zellen. Die Induktion von MART-1 spezifischen $CD8^+$ -T-Zellen wird durch das $IFN\alpha$ -priming von DC gefördert. Pan-T-Zell/DC- Kokulturen wurden zweimal im Abstand von einer Woche mit peptidbeladenen DC restimuliert, anschließend erfolgte die Messung der Frequenz Streptamer-positiver, $CD8$ -positiver T-Zellen. *Kein Peptid* beschreibt aus derselben Population stammende T-Zellen, zu deren Pulsung DC ohne Peptidbeladung verwendet wurden. Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten sind dargestellt. Der Fehlerbalken bezieht sich auf die Standardabweichung der Mittelwerte.

3.1.3.2 Interferon-gamma Produktion

Die durchflusszytometrische Messung der Induktion der $IFN\gamma$ -Sekretion durch die pan-T-Zellen der Kokultur fand im Rahmen der zweiten Restimulation statt. $CD8^+$ -T-Zellen mit intrazellulär nachweisbarem $IFN\gamma$ konnten nur mit einer deutlich niedrigeren Frequenz als Streptamer-positiver T-Zellen dargestellt werden. Hier zeigte sich im MART-1 Modell bei maximal 4-5 % $IFN\gamma^+CD8^+$ -T-Zellen kein signifikanter Unterschied zwischen mit *FastDC* oder mit $IFN\alpha$ -primierter *FastDC* stimulierten T-Zellen. Analog zu der Beobachtung im Rahmen der Streptamer-Färbung konnte auch hier eine deutlich niedrigere Frequenz der $IFN\gamma$ Produktion bei FLU-MA stimulierten Zellen nachgewiesen werden (1-2 %)(Abb: 3.6).

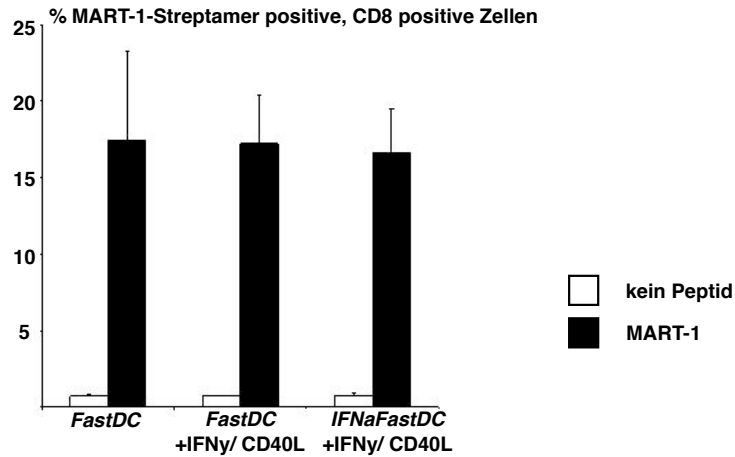


Abbildung 3.4: Die sequenzielle Stimulation von IFN α -geprägten *FastDC* hat keinen signifikanten Einfluss auf die Induktion von MART-1 Streptamer-positiven T-Zellen. Pan-T-Zell/DC- Kokulturen wurden zweimal im Abstand von einer Woche mit DC restimuliert, anschließend erfolgte die Messung der Frequenz Streptamer-positiver, CD8-positiver T-Zellen. Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Der Fehlerbalken beschreibt die Standardabweichung der Mittelwerte.

Zusätzlich wurde jeweils zwei Tage nach der Stimulation oder Restimulation der Kokultur die IFN γ -Konzentration im Überstand gemessen. Konkordant zu den bisherigen Ergebnissen ist die Gesamtproduktion von IFN γ bei der Verwendung von FLU-MA geringer als bei MART-1. Signifikante Unterschiede zwischen *FastDC* und *IFN α FastDC* sind nicht nachweisbar (Abb: 3.5).

Eine zusätzliche sequenzielle Stimulation von *FastDC* und *IFN α FastDC* ergab keine interindividuell konstanten Unterschiede bezüglich der IFN γ Sekretion der mit MART-1 geprägten T-Zellen im Rahmen der zweiten Restimulation. Auch im ELISA konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

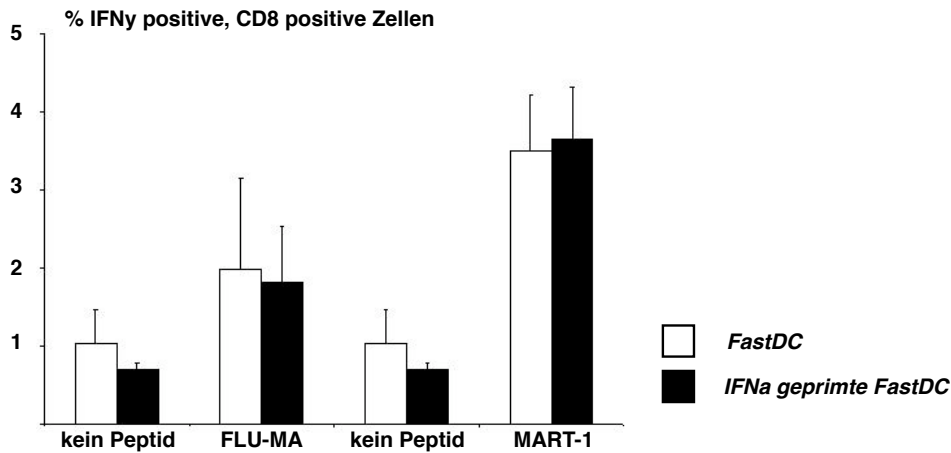


Abbildung 3.5: IFN α -priming von *FastDC* hat keinen Einfluss auf die Induktion FLU-MA- oder MART-1-spezifischer, IFN γ positiver CD8⁺-T-Zellen. Pan-T-Zell/DC- Kokulturen wurden einmal im Abstand von einer Woche mit peptidbeladenen DC restimuliert, anschließend erfolgte erneut eine Woche später im Rahmen der zweiten Restimulation die durchflusszytometrische Messung der Frequenz IFN γ -positiver, CD8-positiver T-Zellen. *Kein Peptid* bezeichnet Kokulturen, zu deren Stimulation ungeladene DC verwendet wurden. Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Der Fehlerbalken beschreibt die Standardabweichung der Mittelwerte.

3.1.3.3 Spezifische Lyse

Zur Überprüfung der lytischen Kapazität der in der Kokultur generierten T-Zellen wurde ein ⁵¹Cr-release assay durchgeführt. Die ⁵¹Cr-Freisetzung ließ sich für beide Modellpeptide in verschiedenen Effektor-target-Verhältnissen gut titrieren. Weder für MART-1 noch für FLU-MA war ein über alle Titrationsstufen vorhandener oder in einer einzelnen Titrationsstufe signifikanter Unterschied zwischen den zur Stimulation der Kulturen eingesetzten DC-Populationen *FastDC* und *IFN α FastDC* nachweisbar (Abb: 3.7).

Dieselbe Versuchsanordnung unter Verwendung von MART-1 als Modellpeptid wurde auch zur Überprüfung des Effektes der sequenziellen Stimulation verwendet. Bei

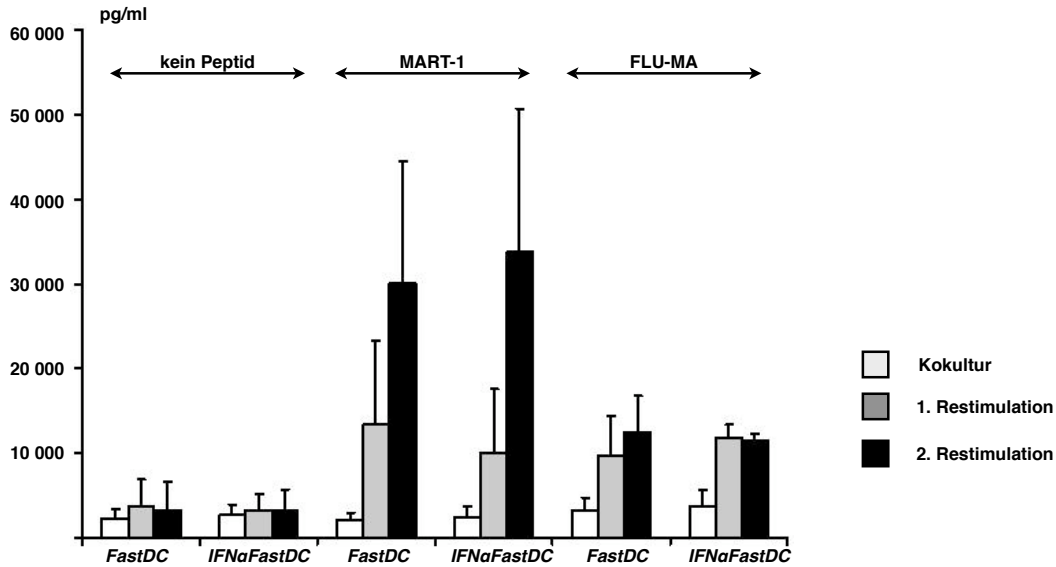


Abbildung 3.6: IFN α -priming von *FastDC* hat keinen signifikanten Einfluss auf die IFN γ -Produktion in MART-1 und FLU-MA spezifischen panT-Zell/ DC Kokulturen. Pan-T-Zell/DC- Kokulturen wurden zweimal im Abstand von einer Woche mit peptidbeladenen DC restimuliert, anschließend erfolgte die Entnahme von Zellüberständen jeweils 48 Stunden nach der Restimulation. *Kein Peptid* bezeichnet Kokulturen, zu deren Stimulation ungepulste DC verwendet wurden. Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Der Fehlerbalken beschreibt die Standardabweichung der Mittelwerte.

insgesamt guter Titrierbarkeit konnte hier eine Tendenz zur Steigerung der spezifischen zytotoxischen Aktivität der mit sequenziell stimulierten DC kultivierten T-Zellen gezeigt werden. Ein über verschiedene Titrationsstufen konstanter Unterschied zwischen mit sequenziell stimulierten *FastDC* und sequenziell stimulierten *IFNαFastDC* kokultivierten T-Zellen war nicht nachweisbar (Abb: 3.8).

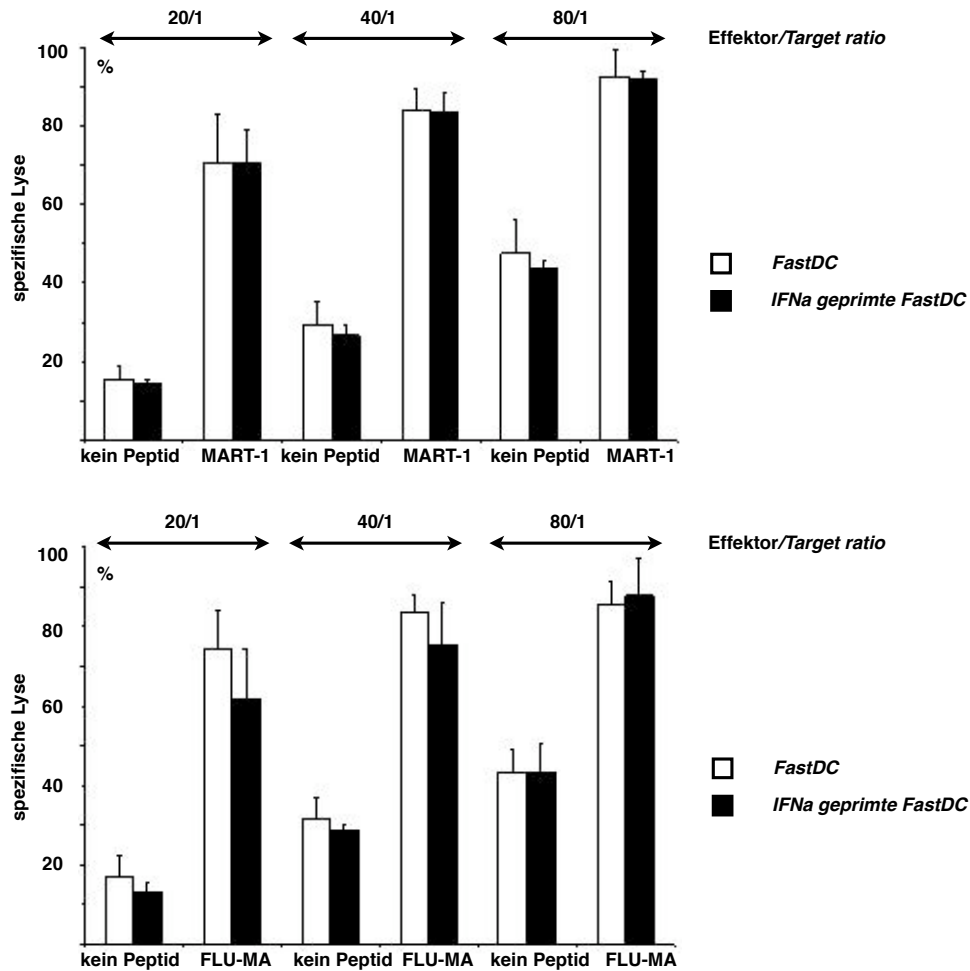


Abbildung 3.7: IFN α -priming von zur Induktion antigenspezifischer T-Zellen eingesetzten *FastDC* hat keinen Einfluss auf die spezifische Lyse. Pan-T-Zell/DC- Kokulturen wurden zweimal im Abstand von einer Woche mit peptidbeladenen *FastDC* restimuliert, anschließend wurde ein ^{51}Cr -release assay durchgeführt. Mit *kein Peptid* sind Bedingungen gekennzeichnet, bei denen zur T-Zellstimulation DC verwendet wurden, die keinen Kontakt zu den entsprechenden Peptiden hatten. Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten, der Fehlerbalken beschreibt die Standardabweichung der Mittelwerte.

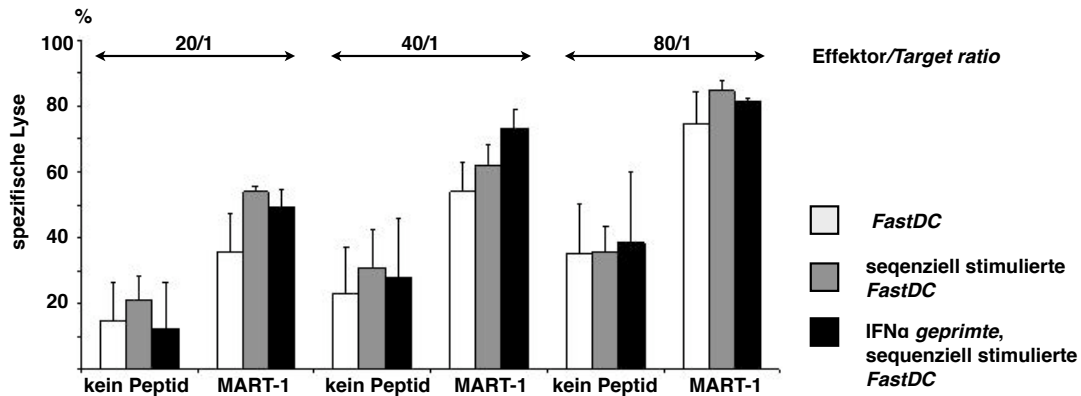


Abbildung 3.8: Die sequenzielle Stimulation von zur Induktion antigenspezifischer T-Zellen eingesetzten *FastDC* mit IFN γ /CD40L fördert die spezifische Lyse antigenpräsentierender *Target*-Zellen. Pan-T-Zell/DC- Kokulturen wurden zweimal im Abstand einer Woche mit peptidbeladenen *FastDC* restimuliert, anschließend wurde ein ^{51}Cr -release assay durchgeführt. Die T-Zellen der Kokultur wurden mit mit MART-1 gepulsten T2-Zellen inkubiert. Mit *kein Peptid* sind Bedingungen gekennzeichnet, bei denen zur T-Zellstimulation DC verwendet wurden, die keinen Kontakt zu den entsprechenden Peptiden hatten. Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Der Fehlerbalken beschreibt die Standardabweichung der Mittelwerte.

3.1.3.4 Messung der Frequenz antigenspezifisch-degranulierender CD8⁺T-Zellen

In Anlehnung an von verschiedenen Arbeitsgruppen publizierte Protokolle [Betts 2003, Rubio 2003, Mittendorf 2005] wurde ein *LAMP-assay* als alternative Methode zur Identifizierung antigenspezifischer CD8⁺T-Zellen etabliert. Ziel einer ersten Versuchsreihe war es, die Sekretionsinhibitoren Brefeldin A und Monesin bezüglich ihrer Eignung in diesem Versuchsansatz zu überprüfen. Daneben sollte ein geeignetes Effektor-Zielzell Verhältnis für eine adäquate Identifizierung degranulierender Zellen ermittelt werden.

Nach Anlage und zweimaliger Restimulation einer pan-T-Zell-*FastDC* Kokultur unter Verwendung des Modellantigens MART-1 wurde ein *LAMP-assay* durchgeführt.

CD8⁺,CD107a/b⁺-T-Zellen waren sowohl unter Verwendung von Brefeldin A, als auch unter Verwendung von Monesin nachweisbar. Brefeldin A behandelte Zellen waren zu einem höheren Prozentsatz eindeutig CD107a/b positiv nachweisbar bei verbesserter Abgrenzbarkeit der Populationen. Die Zahl der degranulierten CD8⁺T-Zellen konnte unter Verwendung beider Sekretionsinhibitoren gut titriert werden. Ein geeignetes Effektor-Zielzell Verhältnis lag bei 10:1 (Abb: 3.9).

Bei der Anwendung des *LAMP-assay* im Vergleich der Degranulation von mit *FastDC* und *IFN α FastDC* stimulierten pan-T-Zellen im MART-1- und FLU-MA-Modell ergab sich ein Ergebnis, das mit den anderen eingesetzten Methoden korrelierte. Der Mittelwert der im MART-1-Modell degranulierenden CD8⁺T-Zellen lag bei 10,4 % für mit *FastDC* stimulierte Kokulturen, wurden *IFN α FastDC* verwendet ergaben sich 13,6 %. Die Tendenz erreichte keine statistische Signifikanz. Für das FLU-MA Modell ergab sich kein Unterschied zwischen den beiden Zellpopulationen (Abb: 3.10).

3.2 Übertragung des α type1DC-Protokolls auf *FastDC*

Für die Gewinnung von konventionell über acht Tage generierten DC publizierten Mailliard et al. ein Protokoll, das den Ersatz von PGE₂ durch pI:C und IFN γ bei der Aktivierung von DC vorsieht [Mailliard 2004]. Im Folgenden werden die Ergebnisse von Versuchen zur Übertragbarkeit dieses Protokolles auf die Generierung von *FastDC* dargestellt.

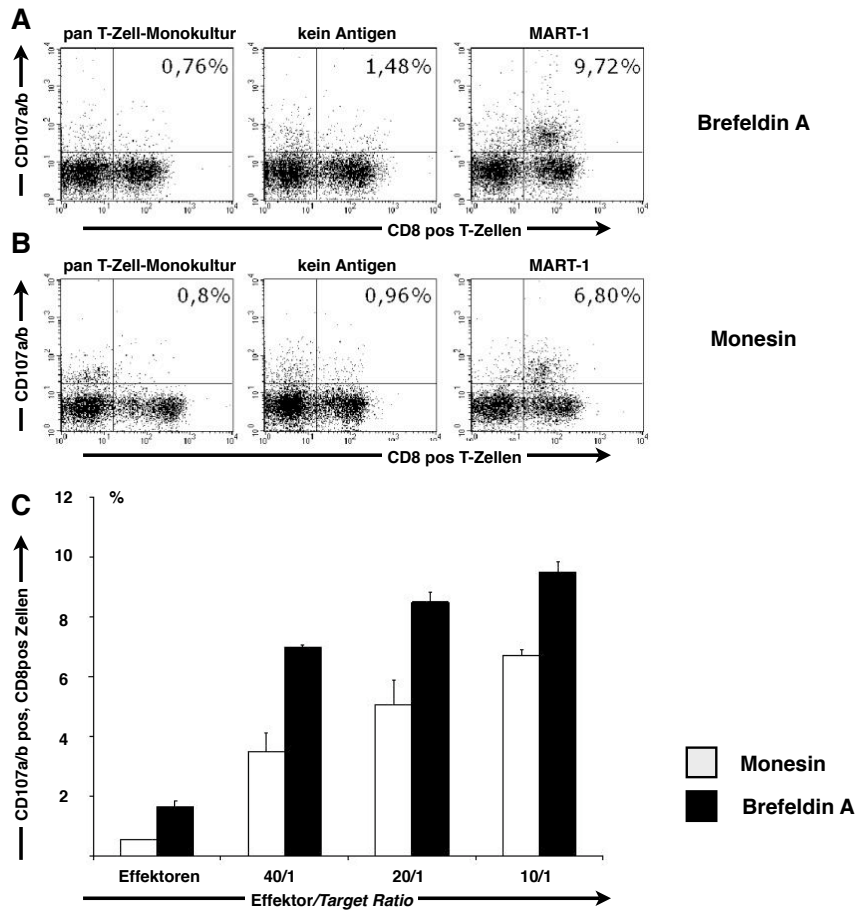


Abbildung 3.9: Der *LAMP-assay* eignet sich zur Identifizierung antigenspezifischer T-Zellen. Pan-T-Zell/DC-Kokulturen wurden zweimal im Abstand einer Woche mit MART-1 beladenen *FastDC* restimuliert, anschließend wurde ein *LAMP-assay* durchgeführt. A + B: Durchflusszytometrische Bestimmung der degranulierenden CD8⁺T-Zellen. Das Effektor/ Zielzell-Verhältnis beträgt 10/1. Die beiden linken Rubriken bezeichnen Effektorzellen aus Kulturen, die nicht- (pan-T-Zell-Monokultur) oder mit ungeladenen (kein Antigen) *FastDC* stimuliert wurden. Darstellung eines Versuches von Zweien mit vergleichbaren Ergebnissen. C: Niedrige Effektor-Zielzell-Verhältnisse sind für eine optimale Darstellung günstig. Frequenz CD8⁺CD107a/b⁺T-Zellen unter Verwendung verschiedener Sekretionsinhibitoren in verschiedenen Effektor-Zielzell-Verhältnissen. Die mit Effektoren beschriftete Bedingung wurde ohne Verwendung von Zielzellen erhoben. Dargestellt ist ein Experiment aus zweien mit vergleichbaren Ergebnissen, die Fehlerbalken beziehen sich auf die Standardabweichung der Messwerttriplikate.

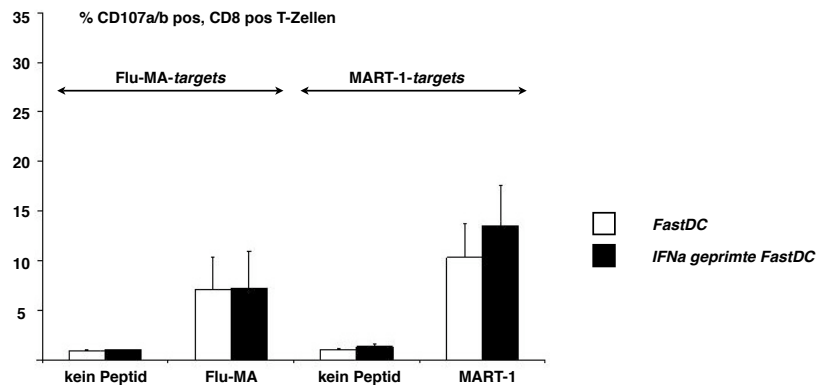


Abbildung 3.10: Der *LAMP-assay* bestätigt die Ergebnisse des ^{51}Cr -release assay. $\text{IFN}\alpha$ -priming von zur Induktion antigenspezifischer T-Zellen eingesetzten *FastDC* hat keinen signifikanten Einfluss auf die spezifische Lyse. Pan-T-Zell/DC- Kokulturen wurden zweimal im Abstand von einer Woche mit peptidbeladenen *FastDC* restimuliert, anschließend wurde ein *LAMP-assay* durchgeführt. Kein Peptid bezeichnet Kontrollexperimente ohne Peptidzugabe im Rahmen der DC-Generierung. Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten sind gezeigt, die Fehlerbalken beziehen sich auf die Standardabweichung der Mittelwerte

3.2.1 Die Expression von Oberflächenmarkern auf *FastDC* und α type1*FastDC*

In einem ersten Versuchsansatz wurde die phänotypische Ausreifung von *FastDC* und $\text{IFN}\alpha$ *FastDC* mit der von α type1*FastDC* und $\text{IFN}\alpha$ -geprimten α type1*FastDC* verglichen. Alle untersuchten Zellpopulationen zeigten nach insgesamt 48 Stunden Kultur einen Verlust des Monozytenmarkers CD14. *FastDC* und $\text{IFN}\alpha$ *FastDC* exprimierten zu 46 % beziehungsweise 42 % CD83, während nur 2 % der α type1*FastDC* den Reifemarker an ihrer Oberfläche zeigten. Dieses Ergebnis war statistisch signifikant, ebenso die Steigerung der CD83-Expression von α type1*FastDC* durch ein $\text{IFN}\alpha$ -priming, wodurch 9 % CD83-Expression erreicht werden konnten. Einen ebenfalls statistisch signifikanten Effekt hatte das $\text{IFN}\alpha$ -priming auf die Expression von CD80 bei α type1*FastDC*: diese konnte von 5 % auf 42 % gesteigert werden, war aber

niedriger als die bei *FastDC* erreichten 57 % und signifikant niedriger als die von *IFN α FastDC* erreichten 65 % (Abb: 3.11).

Durch den Einsatz von pI:C und $IFN\gamma$ nach Mailliard anstelle von PGE_2 im Rahmen eines 24-Stunden Protokolls konnte keine suffiziente phänotypische Ausreifung der Monozyten zu DC erzielt werden.

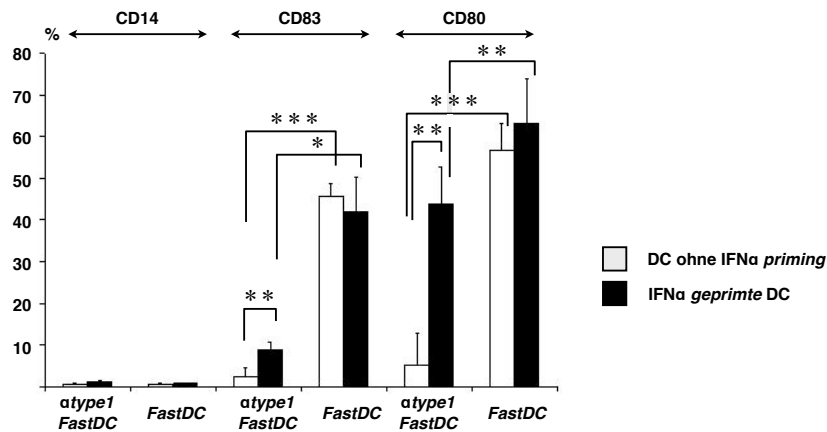


Abbildung 3.11: Die Oberflächenmarker von α type1FastDC entsprechen nicht dem Muster einer reifen DC. $IFN\alpha$ priming kann die Expression von CD80 und CD83 verbessern. *FastDC* wurden den unterschiedlichen Protokollen gemäß stimuliert und nach insgesamt 48 Stunden durchflusszytometrisch nach Markierung der bezeichneten Oberflächenmarker analysiert. Mittelwert aus vier unabhängigen Experimenten, der Fehlerbalken bezieht sich auf die Standardabweichung der Mittelwerte.

3.2.2 Migration von *FastDC* und α type1FastDC

Die Überprüfung der Migrationsfähigkeit von α type1FastDC erfolgte analog zu den oben erläuterten Versuchen mit dem Chemokin CCL21.

Die Zahl der ohne Einsatz eines Chemokins spontan migrierten DC lag in allen Populationen unter 3 %. CCL21 führte bei *migratory FastDC* zu einer signifikanten

Steigerung der Migration auf 26 % im Vergleich zu *atype1FastDC*, die lediglich zu 5% migrierten. Unreife DC migrierten wie erwartet nicht.

3.2.2.1 CCR7-Expression

Die Expression des CCL21 Rezeptors CCR7 korrelierte zwar mit der Migrationsfähigkeit der Zellen, jedoch exprimierten auch unreife DC zu 23 % CCR7, während *migratoryFastDC* zu 46 % CCR7-positiv waren. Die Oberflächenpräsenz des Chemokinrezeptors lag bei *atype1FastDC* mit 20 % signifikant unter der von *migratoryFastDC* (Abb: 3.12).

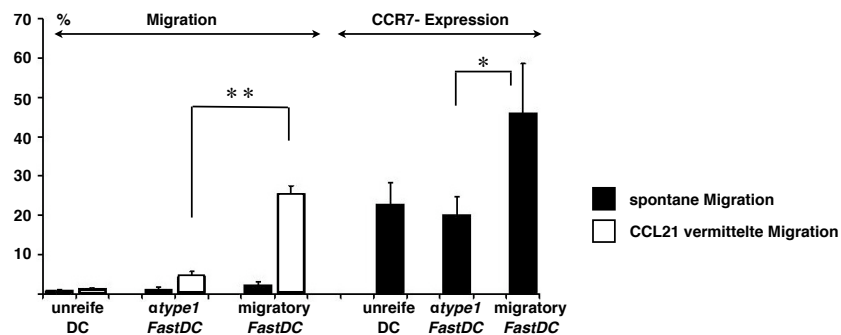


Abbildung 3.12: *atype1FastDC* zeigen eine signifikant niedrigere CCR7-Expression und Fähigkeit zur CCL21-vermittelten Migration als *migratoryFastDC*. Links: migrierten Zellen in % der insgesamt eingesetzten Population. Die Zellen wurden in ein Transwell eingesetzt, die Anzahl der migrierten DC wurde nach zwei Stunden ermittelt. Rechts: CCR7 Expression in %. Die DC wurden den jeweiligen Protokollen gemäß generiert und nach Abschluss der Ausreifung mittels FACS analysiert. Zur Migration eingesetzte und durchflusszytometrisch analysierte Zellen entstammen derselben Population. Mittelwert aus vier unabhängigen Experimenten, der Fehlerbalken bezieht sich auf die Standardabweichung der Mittelwerte.

3.2.3 Produktion von IL-12p70 durch *FastDC* und α type1*FastDC*

FastDC und α type1*FastDC* wurden wie auf S.31 beschrieben generiert. *FastDC* erhielten zusätzlich $\text{IFN}\gamma$ zur Ausreifung. Nach Asservierung des Überstandes bei Ablauf der Differenzierungszeit wurden die Zellen gewaschen und für 24 Stunden mit inaktivierten, CD40L-exprimierenden Zellen inkubiert. Danach wurde erneut Überstand gewonnen. Die Überstände wurden auf ihren IL-12p70 Gehalt untersucht (Abb: 3.13).

Für 24 Stunden mit IL-4/GM-CSF vorstimulierte, unreife DC produzierten bei großen interindividuellen Unterschieden IL-12p70, im Mittel innerhalb der 24 Stunden 520 pg/ml. Die IL-12p70 Produktion dieser DC nach Stimulation mit CD40L entspricht Beobachtungen von Cella et al. und diente als Positivkontrolle [Cella 1996]. Die Zytokinproduktion von α type1*FastDC* war geringer, sie lag bei im Mittel etwa 150 pg/ml, mit einer Tendenz zur Abnahme der Produktion bei $\text{IFN}\alpha$ vorstimulierten DC. *FastDC* konnten wie erwartet kein nachweisbares IL-12p70 produzieren.

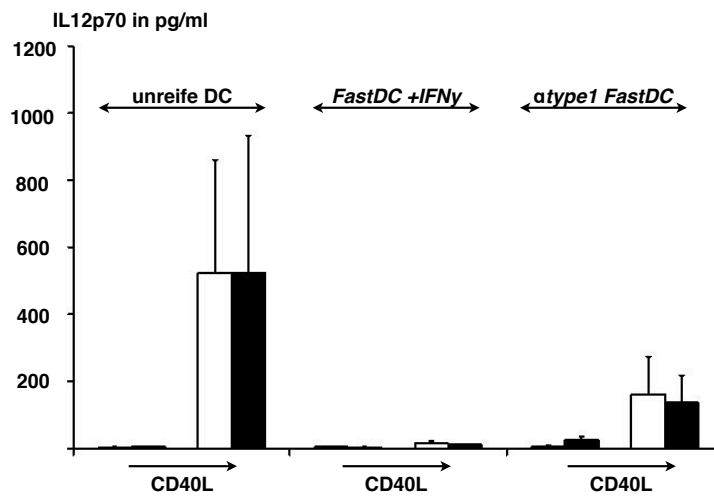


Abbildung 3.13: α type1FastDC können IL-12p70 produzieren. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit inaktivierten, CD40L exprimierenden Stimulatorzellen inkubiert. Vor und nach der Inkubation erfolgte die Entnahme von Zellüberstand und die Analyse mittels ELISA. Helle Balken bezeichnen ohne- dunkle mit IFN α -priming generierte DC. Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Der Fehlerbalken bezieht sich auf die Standardabweichung der Mittelwerte.

3.2 Übertragung des α type1DC-Protokolls auf FastDC

4 Diskussion

4.1 Übersicht über die experimentellen Befunde

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von $IFN\alpha$ bei der Differenzierung von *FastDC* analysiert. Vor dem Hintergrund bereits bekannter positiver Effekte des $IFN\alpha$ -*priming* auf die phänotypische Differenzierung und das Überleben von *FastDC* wurden für die Funktion der DC essenzielle Gesichtspunkte untersucht. Die Migrationsfähigkeit der *FastDC* war äquivalent zur Migrationsfähigkeit von $IFN\alpha$ *FastDC*. Zur Überprüfung der Induktion peptidspezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten wurden verschiedene Methoden verwendet. Hier zeigte sich bei der Verwendung des *Recall*-Antigens FLU-MA kein Vorteil für $IFN\alpha$ *FastDC*, unter Verwendung des tumorassoziierten Antigens MART-1 konnte jedoch in der Streptamer-Färbung ebenso wie im *LAMP-assay* eine Tendenz zur gesteigerten Induktion peptidspezifischer $CD8^+$ T-Zellen bei der Verwendung von $IFN\alpha$ *FastDC* nachgewiesen werden. Auch die $IFN\gamma$ Produktion der T-Zellen korrelierte mit den oben genannten Befunden.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden die oben genannten Zellpopulationen mit T-Zell-abgeleiteten Signalen sequenziell stimuliert und wiederum bezüglich ihrer Migrationsfähigkeit und der Potenz zur Induktion antigenspezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten verglichen. Die Untersuchungen zur CCR7-Expression und Migration der Zellpopulationen – *FastDC* und sequenziell stimulierte *FastDC* mit und ohne $IFN\alpha$ -*priming* wurden verwendet – ergaben keine signifikanten Unterschiede. Zur Ermittlung der Kapazität zur Induktion peptidspezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten wurden erneut verschiedene Methoden eingesetzt. Hier zeigte sich, bei vergleichbaren Ergebnissen der verschiedenen Populationen in der Streptamer-Färbung und der Analyse des intrazellulären $IFN\gamma$, eine Tendenz zur Verbesserung der Zielzellyse im ^{51}Cr -*release assay* bei Einsatz der sequenziellen Stimulation. Ein Unterschied zwischen

unter IFN α -Einfluss differenzierten und konventionell differenzierten *FastDC* war nicht nachweisbar.

Im letzten Teil der Arbeit sollte die Übertragbarkeit eines alternativen, auf Stimulation von TLR3 basierenden Ausreifungsprotokolles auf *FastDC* und auch hier wieder der Einfluss eines IFN α -*priming* geprüft werden. Um den Defekt von *FastDC* in der IL-12p70 Produktion zu überwinden wurde PGE₂ durch pI:C und IFN γ ersetzt. Zwar übte das IFN α -*priming* einen signifikant positiven Effekt auf die Expression von CD80 und CD83 aus, eine mit *FastDC* vergleichbare Ausreifung der *α type1FastDC* konnte jedoch nicht erzielt werden. Der Erwerb der Fähigkeit zur IL-12p70 Sekretion ging mit einem Verlust der CCR7-Expression sowie dem Verlust der Migrationsfähigkeit einher.

4.2 Induktion und Identifizierung antigenspezifischer CD8⁺T-Zellen – Methodendiskussion

4.2.1 Induktion antigenspezifischer CD8⁺T-Zellen

Im Rahmen der durchgeführten Versuche wurden mittels pan-T-Zell-DC-Kokulturen peptidspezifische CD8⁺T-Zell Antworten gegen die Modellpeptide FLU-MA und MART-1 induziert (Abb: 2.1). MART-1 ist ein Tumorantigen, das dem Immunsystem nicht bekannt ist und gegen das eine primäre Immunantwort etabliert wird. FLU-MA ist ein *Recall*-Antigen: Es kann davon ausgegangen werden, dass das Immunsystem des Blutspenders das Peptid im Sinne einer sekundären Immunantwort erkennt. War die Verwendung einer zu lysierenden Zielzelle notwendig, so kamen T2-Zellen zum Einsatz. Diese experimentelle Situation entspricht nicht den Bedingungen *in vivo* und kann mit tumortherapeutischen Ansätzen nur eingeschränkt verglichen werden.

Xu et al. konnten zeigen, dass Subpopulationen MART-1 -spezifischer CD8⁺T-Zellen existieren, die mit MART-1 geprimte T2-Zellen, nicht jedoch MART-1 exprimierende Tumorzellen lysieren können [Xu 2003]. Als Erklärung für diese Beobachtung wird von den Autoren die geringere MART-1-Expression auf den Tumorzellen postuliert. Yang et al. schlagen in einem ähnlichen Ansatz die unterschiedliche Avidität der zytotoxischen T-Zellen als Ursache vor: Hochavide zytotoxische T-Zellen können Tumorzellen eliminieren. Um niedrigaviden zytotoxischen T-Zellen letzteres zu ermöglichen, muss die Antigendichte auf den Tumorzellen erhöht werden. Die Elimination der Tumorzellen ist demzufolge von der Avidität der zytotoxischen T-Zellen im Verhältnis zur Antigendichte auf der Oberfläche der Tumorzelle abhängig [Yang 2002].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Modell auf der Basis der HLA-A2-Peptid Interaktion verwendet. Dieses bietet den Vorteil einer nachweisbar peptidspezifischen und im Rahmen der Verwendung derselben *Target*-Zelllinie mit unterschiedlicher

Peptidbeladung weitgehend von verschiedenen reagierenden Tumorzelllinien unabhängigen Zielzellyse. Ein direkter Vergleich der CD8⁺T-zellstimulatorischen Kapazitäten verschiedener DC-Populationen ist problemlos möglich. Zudem ergeben sich aus der Verwendung definierter Antigene weitere Möglichkeiten der Analyse der Expression peptidspezifischer T-Zell-Rezeptoren und der Elimination der TCR-positiven CD8⁺T-Zellen mittels Streptamer-Technik [Knabel 2002]. Das verwendete Modell eignet sich zum Vergleich unterschiedlich generierter Zellpopulationen, direkte Rückschlüsse auf die Situation *in vivo* sind jedoch nicht möglich.

4.2.2 Ermittlung der Frequenz antigenspezifischer CD8⁺T-Zellen

Insgesamt kamen, häufig parallel, vier verschiedene Methoden zur Ermittlung der Frequenz antigenspezifischer CD8⁺T-Zellen zum Einsatz: MHC-Multimer Färbungen, die Messung der Interferon γ -Produktion, ein ⁵¹Cr-release assay und ein LAMP-assay. Ist es sinnvoll, eine einzige Fragestellung mit verschiedenen, oft experimentell aufwändigen und kostenintensiven Methoden zu beantworten? Und wie lässt sich die Auswahl der Methoden begründen? Clay et al. fordern von einem optimalen assay zur Identifizierung antigenspezifischer CD8⁺T-Zellen vier Eigenschaften [Clay 2001]:

- eine adäquate Sensibilität und Spezifität, eine stabile Funktion und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse
- die Wiedergabe der Situation *in vivo* ohne größere Abbildungsverzerrungen
- eine einfache und schnelle Durchführung
- ein möglichst kleine Ausgangsmenge einzusetzender T-Zellen

Die verwendeten Methoden sollen im Folgenden vor diesem Hintergrund verglichen werden.

4.2.2.1 MHC-Multimere – Nachweis des antigenspezifischen T-Zell-Rezeptors

Bei einer MHC-Multimer-Färbung wird der antigenspezifische TCR auf der Oberfläche der zytotoxischen T-Zelle nachgewiesen. Gleichzeitig können noch andere Oberflächen- oder intrazelluläre Proteine fluoreszenzmarkiert werden. Fong et al. konnten im Rahmen einer *in vivo* Studie einen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen einer Tetramer-Färbung und dem klinischen *response* nachweisen [Fong 2001]. Der experimentelle Ansatz ist einfach durchführbar, jedoch ist die Methode weitgehend auf bekannte Modellpeptide, für die kommerzielle Tetra- oder Streptamere erhältlich sind, beschränkt [Clay 2001]. Es gibt Hinweise auf eine Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Avidität und der Temperatur während des Anfärbvorganges, niedrige Temperaturen erleichtern die vermehrte Anfärbung nichtspezifischer, kreuzreaktiver Oberflächenmoleküle [Whelan 1999, Dutoit 2002]. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Tetramer-positive-CD8⁺T-Zellen nicht gleichzusetzen sind mit peptidspezifisch-zytotoxischen CD8⁺T-Zellen [Jonuleit 2001, Lee 1999, Mackensen 1997]. MHC-Multimer-Färbungen eignen sich zum primären Nachweis antigenspezifischer zytotoxischer T-Zellen und zu Vergleichszwecken bei identisch behandelten Populationen, eine Aussage zur Funktionalität der zytotoxischen T-Zellen kann aber nicht getroffen werden [Banchereau 2001].

4.2.2.2 Interferon-gamma Produktion

IFN γ wurde im Rahmen dieser Arbeit sowohl intrazellulär mittels Durchflusszytometrie als auch mittels ELISA extrazellulär nachgewiesen, beide Ergebnisse korrelierten bezüglich des Sekretionsmusters (Abb: 3.5 und 3.6).

Während die Messung mittels ELISA nur einen Überblick über die in der Kultur freigesetzte Menge an IFN γ bietet, können parallel zum intrazellulären Nachweis von IFN γ weitere Oberflächenmarker, oder auch intrazellulär exprimierte Proteine bestimmt werden [Picker 1995].

Zajak et al. konnten im murinen Modell nachweisen, dass es Tetramer-positive Zellen gibt, die kein intrazelluläres IFN γ aufweisen und daher möglicherweise als ineffektiv anzusehen sind. Ein ähnliches Phänomen wurde von verschiedenen Gruppen auch im humanen Modell beschrieben [Zajak 1998, Goepfert 2000, Rothenfusser 2004]. Die Beobachtung entspricht den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen experimentellen Befunden: In dreifach mit MART-1 gepulsten *FastDC* stimulierten CD8⁺T-Zell-Populationen konnten mittels Streptameren bis zu 22 % CD8⁺T-Zellen mit MART-1 spezifischem TCR nachgewiesen werden (Abb: 3.3), die Frequenz IFN γ produzierender CD8⁺T-Zellen erreichte lediglich 3,6 % (Abb: 3.5). Nicht ausgeschlossen werden kann jedoch auch ein Effekt des zeitlichen Ablaufes auf diese Beobachtung, da die Streptamer-Färbungen ca. 50 Stunden nach der Messung des intrazellulären IFN γ durchgeführt wurden (Abb: 2.1).

4.2.2.3 ⁵¹Cr-release assay – semiquantitative Messung der lysierten Target-Zellen

Der ⁵¹Cr-release assay gilt noch immer als Goldstandard zur Quantifizierung der antigenspezifischen lytischen Aktivität zytotoxischer Lymphozyten. Als einzige im Rahmen dieser Arbeit verwendete Methode erlaubt der assay den direkten, jedoch nur semiquantitativen Nachweis der Zielzellyse [Brunner 1968]. Die Durchführung ist experimentell aufwändig und an ein Radioaktivlabor mit *Gamma-Counter* gebunden. Informationen über die Frequenz und die Identität der die Zielzellyse induzierenden Zellen können nicht gewonnen werden.

4.2.2.4 LAMP-assay – Welche CD8⁺T-Zellen degranulieren?

Der *LAMP-assay* zum Nachweis antigenspezifischer zytotoxischer T-Zellen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit in der Arbeitsgruppe etabliert (S.55). Betts et al. stellten die Methode 2003 erstmals vor, Burkett et al. konnten 2005 die direkte Korrelation LAMP-positiver Zellen mit der Rate lysierter *Target*-Zellen nachweisen

[Betts 2003, Burkett 2005]. Der *LAMP-assay* bestätigt die funktionelle Heterogenität der CD8⁺T-Zellpopulationen: nur ein Teil der MHC-Multimer-positiven Zellen degranuliert bei Kontakt mit peptidbeladenen T2-Zellen, von letzteren produziert wiederum nur ein Teil IFN γ [Betts 2003]. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde entsprechen diesen Beobachtungen (Abb: 3.3, 3.5 und 3.10, die Abbildungen beziehen sich auf dieselben Zellpopulationen).

4.2.3 Kann der *LAMP-assay* andere Methoden ersetzen?

Mit zunehmender Verbreitung des *LAMP-assay* verliert der seit 1968 verwendete ⁵¹*Cr-release assay* seinen Stellenwert in der immunologischen Diagnostik. Verschiedene Arbeitsgruppen haben die Korrelation der Ergebnisse beider Methoden nachgewiesen, die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde bestätigten diese Daten (Abb: 3.10 und 3.7, beide Abbildungen beziehen sich auf dieselbe Zellpopulation) [Mittendorf 2005, Rubio 2003]. Ein einziges Argument spricht für den ⁵¹*Cr-release assay*: er weist, wenn auch nur semiquantitativ, direkt die lysierten Zellen nach. Der *LAMP-assay* bietet einige Vorteile gegenüber dem ⁵¹*Cr-release assay*. Betrachtet man die von Clay et al. publizierten Anforderungen an einen guten T-Zell-*assay*, so betreffen die Vorteile vor allem die letzten beiden Punkte (S.67): Für einen *LAMP-assay* ist im Gegensatz zum ⁵¹*Cr-release assay* kein Arbeiten mit radioaktiven Chemikalien notwendig, der logistische Aufwand wird erheblich gesenkt. Gleichzeitig können weitere Oberflächenmarker der T-Zellen, antigenspezifische TCR mittels Multimer-Technik oder auch intrazellulär Zytokine wie IFN γ markiert werden, so dass eine umfassende Charakterisierung der einzelnen Zelle in einem einzigen Ansatz möglich ist [Betts 2003, Burkett 2005, Clay 2001]. Da für einen *LAMP-assay* keine Fixierung oder Permeabilisierung der T-Zelle notwendig ist, können auf diesem Weg auch T-Zellpopulationen selektiert und für weitere Versuche verwendet werden [Rubio 2003].

Um im Rahmen klinischer Studien mittels eines ⁵¹*Cr-release assay*, ohne vorherige Expansion der Zellen, tumorspezifische zytotoxische T-Lymphozyten nachzuweisen

wäre etwa ein Liter Blut notwendig. Der *LAMP-assay* ist mit deutlich geringeren Mengen an Effektoren durchführbar und ist zur Zeit der einzige klinisch einsetzbare *assay*, der Aussagen über die Zytotoxizität der tumorspezifischen zytotoxischen Zellen erlaubt [Devèvre 2006].

Der *LAMP-assay* kann alternativ zum ^{51}Cr -*release assay* eingesetzt werden, aber kann er auch die Messung des intrazellulären $\text{IFN}\gamma$ und die Multimerfärbungen ersetzen? Die aktuell von verschiedenen Autoren vertretene Auffassung, dass Populationen zytotoxischer T-Zellen heterogen sind bezüglich ihrer Anteile peptidspezifischer, zytokinproduzierender und degranulierender Zellen spricht dagegen: Um eine umfassende Information über das funktionelle Spektrum der zytotoxischen T-Zellen zu erhalten bleibt die Kombination verschiedener Methoden notwendig [Betts 2004, Valitutti 1996]. Seit Entwicklung des *LAMP-assay* lässt sich jedoch das funktionelle Profil einzelner Zellen in einem einzigen Versuchsansatz darstellen.

4.3 Die Chemokinrezeptorexpression in Korrelation mit der Migration der dendritischen Zellen

Die Fähigkeit der DC nach CCR7-vermittelter Migration in die T-Zell Zone des Lymphknotens zu gelangen ist essenziell für die Tumorthherapie. Daher wurde die Migration aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellpopulationen überprüft und mit der jeweiligen CCR7-Expression der Zellen verglichen.

Mehrfach war auch auf nicht- oder nur minimal migrierenden Zellen eine signifikante CCR7-Expression nachweisbar, die funktionslos im Bezug auf die tatsächliche Migration der DC war (Abb: 3.1, 3.2 und 3.12). Als entscheidende Voraussetzung für die Funktionsfähigkeit des CCR7-Rezeptors gilt die PGE_2 -Exposition von DC zu Beginn der Reifeinduktion. Dieser Vorgang entspricht möglicherweise *in vivo* der PGE_2 -Exposition durch aktivierte Makrophagen und Fibroblasten im Rahmen einer Inflammation [Legler 2006, Luft 2002, Scandella 2002]. In Abb. 3.2 wird der Effekt

fehlender PGE₂-Exposition auf die Migration reifer DC bei sonst unveränderten Bedingungen deutlich.

Scandella et al. konnten zeigen, dass PGE₂ zwar auch die Oberflächenexpression von CCR7 fördert, seine für die Migrationsfähigkeit der DC entscheidende Wirkung aber vermutlich in der Kopplung des CCR7 an intrazelluläre Signalwege besteht [Scandella 2002]. Andere Gruppen konnten migrierende DC ohne die Zugabe von exogenem PGE₂ generieren [Sozanni 1998]. Hierbei spielt jedoch möglicherweise die Verwendung von FCS im Kulturmedium eine Rolle, da FCS die Generierung endogener Prostaglandine ermöglicht [Serhan 1996, Scandella 2002]. Ungeklärt bleibt vor diesem Hintergrund die von Mailliard et al. beobachtete Migration von mit einem PGE₂-freien Zytokincocktail in serumfreiem Medium generierten *αtype1DC*, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit im *FastDC*-Modell nicht bestätigt werden konnte (Abb: 3.12) [Mailliard 2004].

Ohl et al. beschrieben die CCR7-abhängige stetige Migration unreifer DC zur Toleranzinduktion in den Lymphknoten. Dieser Mechanismus bietet eine Erklärung für die geringe Migration unreifer DC (Abb: 3.1) [Ohl 2004]. Noch ungeklärt bleibt, ob die über die Migration hinausgehenden Funktionen des CCR7, etwa der antiapoptische Effekt oder die Förderung der Dendritenbildung ebenfalls PGE₂-abhängig sind (S.5) [Sánchez-Sánchez 2006]. Diese Frage führt zu der Überlegung, ob CCR7-Liganden als zusätzlicher Reifestimulus zu verwenden sind um eine der physiologischen Situation entsprechende Ausreifungssituation für DC zu schaffen [Marsland 2005].

4.4 Die Problematik der IL-12p70 Defizienz

Die Produktion von IL-12p70 ist ein wichtiges Element zur Induktion einer Th1-gewichteten Immunantwort *in vivo* und wird als ein entscheidender Faktor für eine erfolgreiche Tumorthherapie mit DC angesehen [Nishimura 2000, Hsieh 1993]. IL-12p70 fördert die Entstehung zytotoxischer CD8⁺ Lymphozyten, ihre IFN γ Pro-

duktion und die Zytotoxizität von NK-Zellen [Trinchieri 2003]. Xu et al. konnten zeigen, dass IL-12p70 die Erkennungsschärfe zytotoxischer CD8⁺T-Zellen erhöht, so dass auch Zielzellen mit niedrigerer Antigendichte auf der Oberfläche erkannt und lysiert werden können [Xu 2003].

4.4.1 Der Einfluss von IFN α auf die IL-12p70 Sekretion dendritischer Zellen

IFN α galt, basierend auf einer Arbeit von McRae et al., längere Zeit als Suppressor der IL-12p70 Produktion von DC [McRae 1998]. Neueren Arbeiten von Heystek et al. zufolge trifft diese Beobachtung jedoch nicht zu, sofern IFN α bereits während der Ausreifung der DC zugegen ist. Die Kombination mit IFN γ führt bei Heystek et al unabhängig vom Zeitpunkt der IFN α -Zugabe zur Suppression der IL-12p70 Produktion von DC [Heystek 2003]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen Teile dieser Beobachtungen. Die IL-12p70 Freisetzung CD40L-stimulierter DC ist vom IFN α -*priming* der DC unabhängig (Abb: 3.13). Zu einem anderen Ergebnis kamen Mailliard et al.: Unter zusätzlicher Verwendung des TLR3-Liganden pI:C wiesen sie eine erhebliche Steigerung der IL-12p70 Produktion nach, wenn IFN α und IFN γ parallel zur DC-Ausreifung eingesetzt wurden [Mailliard 2004].

Der Einfluss von IFN α auf die IL-12p70 Produktion der DC ist offenbar erheblich von verschiedenen Einzelfaktoren bei ihrer Generierung abhängig und kann nicht allgemein als fördernd oder suppressiv bezeichnet werden.

4.4.2 Prostaglandin E₂ hemmt die IL-12p70 Produktion dendritischer Zellen

PGE₂ unterdrückt die CD40- getriggerte IL-12p70 Produktion von DC, erhöht die Freisetzung von IL-10 und sorgt im Umfeld maligner Tumore für eine Th2-Polarisation der CD4⁺T-Zellen [Xu 2003, Kalinski 2001, Mailliard 2004, Lee 2002]. Es gibt Hinweise darauf, dass allein die regulatorisch wirksame p40 Untereinheit nach Stimulation mit PGE₂ ausgeschüttet wird und so eine überschießende Immunantwort ver-

hindert [Kalinski 2001, Schnurr 2005]. PGE₂ wird jedoch in der Literatur als essenziell für die Migration von DC beschrieben (S. 71). Der Umstand, dass zwei der entscheidenden Funktionen von DC, die Migration und die IL-12p70 Produktion, nicht parallel induziert werden können ist eines der zentralen Probleme der aktuellen Forschung. Auf den ersten Blick bieten sich zwei Lösungsansätze an: Entweder wird versucht, eine Migration ohne PGE₂ zu ermöglichen, oder aber in DC, die mit PGE₂ ausgereift wurden, wird die Freisetzung von IL-12p70 induziert.

4.4.3 Die Induktion einer Th1-Antwort in IL-12p70-defizienten Kokulturen

Trotz fehlender IL-12p70-Sekretion konnten sowohl *FastDC* als auch *IFN α FastDC* – mit erhöhter Effizienz nach sequenzieller Stimulation – antigenspezifische Th1-Immunantworten in Kokulturen mit pan-T-Zellen induzieren (Abb: 3.7 und 3.8). Weitere Beispiele für die Induktion von Th1-Antworten trotz der Verwendung IL-12p70-defizienter DC, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, finden sich in der Literatur [Lee 2002, Mothy 2003, Schuler-Thurner 2002, Wan 2001]. Möglicherweise wurde die IL-12p70 Produktion als essenzieller Faktor zu Induktion antigenspezifischer zytotoxischer T-Zellen lange Zeit überschätzt.

Aktuell werden alternative Modelle der Entstehung von Th1-Immunantworten diskutiert. An dieser Stelle sind vor allem andere Zytokine der IL-12-Gruppe und IL-15 zu nennen. IL-15 kann eine IL-12p70 unabhängige Th1-Antwort ermöglichen und kam daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit als möglicherweise Th1-induzierendes Zytokin in Frage (siehe auch S.9) [Santini 2000, Zhang 1998, Kuniyoshi 1999]. In einem im Rahmen dieser Arbeit vor diesem Hintergrund durchgeführten ELISA war jedoch kein IL-15 nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Trotzdem kann ein Einfluss des Zytokins auf die Induktion der Th1-Immunantwort nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden. Zum einen liegen neueren Erkenntnissen zufolge erhebliche Anteile des IL-15 membrangebunden vor, sind also im ELISA nicht nachweisbar. Zum anderen konnten Allewa et al. zeigen, dass Makrophagen auf IL-15-Konzentrationen rea-

gieren, die deutlich unterhalb der Nachweisgrenze kommerziell erhältlicher ELISA-Reagenziensätze liegen [Dubois 2002, Waldmann 2006, Alleva 1997].

Die Beteiligung weiterer möglicherweise involvierter Zytokine der IL-12-Gruppe (IL-27, IL-23 und IL-18) an der Induktion IL-12p70 unabhängiger Th1-Antworten konnte noch nicht endgültig geklärt werden [Dauer 2006]. Daneben gibt es Hinweise darauf, dass eine den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellzahlen entsprechende, hohe DC/T-Zell-Ratio einen Th1-induzierenden Effekt hat. Eine prozentual große Anzahl verfügbarer DC führt eher zur Induktion einer Th1-Antwort, was letztendlich vor dem Hintergrund der DC als Tumorstimulanz zum einen den Stellenwert der Migrationsfähigkeit reifer DC noch einmal hervorhebt (S.17), zum anderen aber auch die Ausbeute an reifen DC als Einflussfaktor betont [Tanaka 2000]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Induktion einer Th1-Antwort *in vitro* mit IL-12p70 defizienten DC möglich ist. Inwieweit dies der Situation *in vivo* entspricht, und in welchem Ausmaß verschiedene Faktoren Einfluss auf die Induktion der Th1-Antwort haben ist jedoch nach wie vor unklar.

4.5 *IFN α FastDC* im Vergleich zu anderen Protokollen zur DC-Generierung

Die Effekte der Verwendung von IFN α im Rahmen der DC-Generierung wurden von verschiedenen Gruppen untersucht [Radvanyi 1999, Tough 2004]. Gauzzi et al. konnten zeigen, dass TypI-Interferone vor allem in frühen Phasen der Differenzierung effektiv sind, entsprechend der Situation *in vivo* mit erhöhten TypI-Interferonkonzentrationen vor allem im inflammatorischen Gewebe (S.11) [Gauzzi 2002]. Ein Großteil der darüber hinaus vorhandenen Daten bezüglich des Einflusses von IFN α auf die Generierung von DC aus Monozyten stammt aus Versuchen, IL-4 durch IFN α zu ersetzen. Letztere wurden von verschiedenen Gruppen unternommen, nachdem Thurnher et al. einen negativen Einfluss von IL-4 auf die Differenzierung und Funktion von DC postuliert hatten [Thurnher 2001]. Della Bella et al. entwickelten ein

Protokoll zur IL-4-freien DC-Herstellung [Della Bella 2004], andere Gruppen konnten jedoch ohne IL-4 Zugabe keine DC generieren [Dauer 2003, Tosi 2004].

Tosi et al. konnten eine mögliche Ursache der divergierenden Ergebnisse aufzeigen. Die Monozytenisolate waren mit NK-Zellen kontaminiert, diese wurden durch die $IFN\alpha$ -Zugabe aktiviert und interagierten mit den DC [Tosi 2004]. Die Berichte anderer Gruppen, die aus Monozytenisolaten höherer Reinheit – in einigen Fällen unter zusätzlicher Depletion von $CD56^+$ NK Zellen – ohne den Zusatz von IL-4 DC generieren konnten können jedoch nicht mit der Beobachtung von Tosi et al. erklärt werden [Mothy 2003, Parlato 2001]. Auffallend ist, dass der Ersatz von IL-4 immer nur dann möglich war wenn FCS im Kulturmedium verwendet wurde, was zum einen – die Verwendung von Fremdproteinen beeinflusst erheblich die Ausreifung von DC – einen weiteren Lösungsansatz der oben angesprochenen Problematik der IL-4-freien DC-Generierung bietet, zum anderen aber die IL-4-frei generierten DC für den klinischen Einsatz disqualifiziert. Bei Verwendung von FCS in der Kultur von DC muss mit der Induktion einer Immunantwort gegen bovine Proteine gerechnet werden [Toldbod 2003, Royer 2006].

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde knüpfen an bereits bekannte Daten zum Effekt der additiven Verwendung von $IFN\alpha$ zusätzlich zu IL-4/GM-CSF bei der Differenzierung von Monozyten zu DC an: Im *FastDC*-Modell hat die $IFN\alpha$ -Zugabe keinen Einfluss auf Ausbeute und Überleben der *FastDC*. Die CD80-, CD83- und CCR7-Expression von *IFN\alpha FastDC* ist gegenüber *FastDC* gesteigert und bleibt nach komplettem Zytokinenzug länger stabil. Die Reexpression von IL-14 auf *IFN\alpha FastDC* nach Zytokinenzug ist vermindert [Dauer 2006]. Zusätzlich gibt es Hinweise auf eine erhöhte Aktivierung von T-Gedächtniszellen durch *IFN\alpha FastDC* im Vergleich zu *FastDC*. Unterschiede bezüglich der Expression von IL-23 oder IL-18, die dieses Verhalten erklären könnten, waren jedoch bisher nicht nachweisbar [Schad 2008]. Miyatake et al. konnten kürzlich für über sieben Tage generierte $IFN\alpha$ DC eine erhöhte CD86-Expression und die vermehrte Induktion von Th1-T-Zellantworten bei reduzierter IL-10 Freisetzung im Vergleich zu mit IL-4/GM-CSF differenzierten DC nachweisen [Miyatake 2007]. Im Rahmen der vor-

liegenden Arbeit konnte neben der unter $\text{IFN}\alpha$ -Zugabe unveränderten Migrationsfähigkeit ein Anstieg der Frequenz antigenspezifischer CD8^+ T-Zellen nach Stimulation der Kokultur mit *IFN* α *FastDC* beobachtet werden. Der Effekt beschränkt sich auf das Modellpeptid MART-1 und somit auf die primäre Induktion einer CD8^+ T-Zell-Antwort, er war für das Recall-Antigen FLU-MA nicht nachweisbar (Abb: 3.3).

Zwischen sequenziell stimulierten *FastDC* und sequenziell stimulierten *IFN* α *FastDC* war unter Verwendung von MART-1 kein Unterschied nachweisbar (Abb: 3.4). Eine mögliche Erklärung für die Aufhebung des $\text{IFN}\alpha$ -Effektes nach sequenzieller Stimulation bieten Untersuchungen von Papewalis et al., die eine $\text{IFN}\gamma$ Produktion durch $\text{IFN}\alpha$ -stimulierte DC nachweisen konnten [Papewalis 2008]. Hier entseht also möglicherweise die $\text{IFN}\gamma$ -Komponente der sequenziellen Stimulation bei $\text{IFN}\alpha$ -geprägten *FastDC* endogen. Letztlich kann, trotz der durchgehend erreichten hohen Reinheit der isolierten Monozyten in der initialen Kultur (>95 %, Daten nicht gezeigt) auch eine Kontamination mit NK-Zellen nicht ausgeschlossen werden. Diese können nach Stimulation mit $\text{IFN}\alpha$ ebenfalls $\text{IFN}\gamma$ produzieren [Walzer 2005].

4.6 Die sequenzielle Stimulation

Die sequenzielle Stimulation beinhaltet einen in unserer Arbeitsgruppe entwickelten dritten, den Kontakt zur antigenspezifischen T-Zelle imitierenden Stimulations-schritt bei der Generierung von DC *in vitro* (S.20).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die sequenzielle Stimulation die Migrationsfähigkeit von DC nicht beeinflusst und die Induktion einer antigenspezifischen CD8^+ T-Zell-Antwort fördert (Abb: 3.2 und 3.8). Ergänzend konnten Luft et al. feststellen, dass sowohl $\text{IFN}\alpha$ als auch CD40L die stabile Antigenpräsentation der DC verlängern [Luft 2002a]. Alder et al. publizierten Beobachtungen, denen zufolge die Zugabe von $\text{IFN}\gamma$ zum Standardausreifungscocktail im konventionellen wie auch im *FastDC*-Modell die CD83- und CCR7-Expression sowie die

Migration der DC hemmt [Alder 2006]. Keines dieser Phänomene konnte von uns beobachtet werden. Allerdings unterscheidet sich der $\text{IFN}\gamma$ -Einsatz von Alder et al. sowohl bezüglich der zeitlichen Abfolge, als auch im Hinblick auf die Verwendung von CD40L von der an die physiologischen Vorgänge – Exposition mit inflammatorischen Stimuli, daraufhin Migration in den Lymphknoten und dort Kontakt mit CD40L und $\text{IFN}\gamma$ – angelehnten sequenziellen Stimulation. Eine gerade bezüglich der physiologischen Situation interessante Beobachtung beschrieben Luft et al.. Sie konnten nachweisen, dass der Effekt der Stimulation mit CD40L von der Bindungsstärke und Bindungsdauer des Liganden abhängt. Kurze und schwache Stimulation führte zur Migration der DC, während ein starker und persistierender Stimulus entsprechend dem Kontakt mit einer das präsentierte Antigen erkennenden T-Zelle die DC zur Zytokinproduktion anregte [Luft 2004].

Die von T-Zellen ausgehenden Faktoren CD40L und $\text{IFN}\gamma$ haben, fasst man die oben geschilderten Beobachtungen zusammen, einen erheblichen Einfluss auf die Ausreifung von DC. Die Ergebnisse der Versuche zur Stabilität der Oberflächenmoleküle nach Zytokinentzug und zur Stabilität der Antigenpräsentation legen nahe, dass von einer vollständigen Ausreifung der DC erst nach der sequenziellen Stimulation, respektive dem Kontakt mit der das Antigen erkennenden T-Zelle, ausgegangen werden kann [Dauer 2006]. Das Überleben einer DC, die ein relevantes Antigen präsentiert, wird so von den das Antigen erkennenden T-Zellen gefördert [Luft 2002a].

4.7 Der Stellenwert von α type1FastDC als alternatives Ausreifungsprotokoll

Mailliard et al. beschrieben die suffiziente Ausreifung von DC in einem Zytokincocktail aus $\text{IFN}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, pI:C, $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$. Die Zellen wiesen eine gute Migrationsfähigkeit und die Fähigkeit zur IL-12p70 Sekretion auf [Mailliard 2004]. Zwar konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die CD80- und CD86-Expression von α type1FastDC durch die zusätzliche Verwendung von $\text{IFN}\alpha$ zum Zeitpunkt der Dif-

ferenzierung der DC aus Monozyten signifikant gesteigert werden, eine mit *FastDC* vergleichbare Ausreifung war aber nicht zu erreichen (Abb: 3.11). α type1*FastDC* migrierten nicht, produzierten aber IL-12p70 (Abb: 3.12 und 3.13). Das Protokoll zur Ausreifung von α type1DC erwies sich somit als nicht auf das *FastDC*-Konzept übertragbar.

Eine ähnliche Beobachtung machten Trepiaikas et al. bei dem Versuch, α type1DC aus den Monozyten von Karzinompatienten zu generieren: Ein stabiler Phänotyp konnte nicht erreicht werden, vielmehr wurde die CD83 Expression auf α type1DC im Verlauf wieder herunterreguliert. Auch eine allogene T-Zellantwort konnte von α type1DC im Vergleich zu Standard-DC nur eingeschränkt induziert werden bei vergleichbarer Kapazität beider Zellpopulationen zur Induktion einer peptidspezifischen T-Zellantwort [Trepiaikas 2008]. Demgegenüber stehen Ergebnisse von Lee et al., die unter Verwendung von Monozyten von CLL-Patienten über adäquate Ausreifung, IL-12p70 Produktion und eine den Standard-DC überlegene Induktion antigenspezifischer CD8⁺T-Zellen berichteten. Allerdings waren diese Ergebnisse hochgradig vom verwendeten Kulturmedium abhängig [Lee 2008]. In beiden Berichten zur Verwendung von α type1DC bei Patienten mit malignen Erkrankungen finden sich keine Aussagen zur Migration [Lee 2008, Trepiaikas 2008].

4.8 Ist eine Annäherung an die Physiologie dendritischer Zellen möglich ?

Eng verbunden mit dem Versuch *in vitro* DC herzustellen die in der Lage sind *in vivo* möglichst effiziente T-Zellantworten zu induzieren ist die Überlegung, ob auf diese Weise auch die Entstehung einer DC *in vivo* abläuft, und ob das Verhalten der so erzeugten DC Rückschlüsse auf die Physiologie erlaubt. Je größer das Wissen über die physiologischen Vorgänge bei der Entstehung einer Immunantwort ist, desto gezielter kann ein Eingriff in die komplexen Mechanismen erfolgen.

Es bestehen seit längerer Zeit Hinweise darauf, dass DC auch *in vivo* aus Monozyten entstehen. Randolph et al. konnten 1998 zeigen, dass aus Monozyten beim Durchwandern eines Endothels DC werden, und Blanco et al. stellten 2001 fest, dass Monozyten im Serum von Patienten mit systemischem Lupus Erythematoses spontan zu DC ausreifen [Randolph 1998, Blanco 2001]. Dieser Differenzierungsweg konnte kürzlich bewiesen werden. Ginhoux et al. konnten im Mausmodell zeigen, dass Monozyten direkte Vorläufer der Langerhanszellen sind [Ginhoux 2006].

Da $\text{IFN}\alpha$ im inflammatorischen Gewebe vorliegt entspricht der Kontakt von DC mit $\text{IFN}\alpha$ in frühen Phasen der Differenzierung mit hoher Wahrscheinlichkeit der Physiologie. In diesem Zusammenhang erscheinen die bereits vorbekannten und die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde, die Verbesserung der Stabilität des Phänotypes, die verstärkte Expression kostimulatorischer Oberflächenmarker und die erhöhte Potenz zur Induktion einer antigenspezifischen CD8^+ T-Zell-Antwort stimmig (Abb: 3.3) [Dauer 2006].

Die sequenzielle Stimulation imitiert den auf die inflammatorischen Stimuli folgenden Kontakt der DC mit T-Zellen. Zusätzlich zu der schon bekannten verlängerten Expression von Oberflächenmarkern konnte im Rahmen dieser Arbeit auch eine verbesserte Induktion peptidspezifischer CD8^+ T-Zellen nachgewiesen werden (Abb: 3.8) [Dauer 2006]. Garg et al. demonstrierten im Mausmodell, dass DC bis zu zwei Wochen im Lymphknoten verweilen [Garg 2003]. Zusammen mit den Ergebnissen von Ludewig et al., die die Abhängigkeit der Immunantwort von der stabilen Expression des antigenbeladenen MHC I unterstreichen ergeben sich Hinweise darauf, dass die sequenzielle Stimulation *in vitro* über die Imitation möglicher Vorgänge *in vivo* zu einem der Physiologie entsprechenden Verhalten der DC und zu einer gesteigerten Immunantwort führt [Ludewig 2001].

4.9 Klinische Relevanz

Die Intention DC zu generieren, die ein möglichst gut geeignetes Instrument zur Tumorthherapie darstellen, ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit. Daher sollen im Folgenden die experimentellen Befunde bezüglich ihrer Relevanz für den klinischen Einsatz der DC diskutiert werden.

Aus der Notwendigkeit zur Verwendung reifer DC zur Induktion einer zytotoxischen Immunantwort ergeben sich für den klinischen Einsatz der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zellpopulationen verschiedene Aspekte. *αtype1FastDC* erreichen nicht den Phänotyp einer reifen DC (Abb: 3.11), folglich ist auch *in vivo*, im Rahmen einer Therapie mit diesen DC, keine Induktion antigenspezifischer zytotoxischer T-Zellen zu erwarten. Sequenziell stimulierte *IFNαFastDC* dagegen qualifizieren sich aufgrund des auch nach Zytokinentzug lange stabilen reifen Phänotypes besonders für die Induktion einer Immunantwort *in vivo* [Dauer 2006].

Im Rahmen einer Tumorthherapie kommt ein weiterer Mechanismus zum Tragen, der im *in vitro*-Modell zur Induktion antigenspezifischer zytotoxischer T-Zellen keinen Einfluss ausüben kann: Zu den immunsuppressiven Eigenschaften vieler maligner Tumore gehört die Erzeugung einer CD4⁺T-Zell Anergie [Rabinovich 2007]. CD40L kann den Kontakt mit einer Th-Zelle ersetzen [Ridge 1998]. Während also in der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kokultur CD40L auch von Th-Zellen zur Verfügung gestellt wird, kann durch die Verwendung einer sequenziellen Stimulation zur Generierung von für eine Tumorstimulanz vorgesehenen DC ein vom Tumor ausgehender immunsuppressiver Mechanismus möglicherweise umgangen werden. Vor diesem Hintergrund und aufgrund der IL-12p70 unabhängigen Th1-Antwort ergibt sich möglicherweise ein Gegenargument zu einer These von Gilboa, der vorschlägt die Stimulation mit CD40L nicht schon *ex vivo* durchzuführen um die dadurch ausgelöste kurzfristige IL-12p70 Freisetzung *in vivo* zu nutzen [Gilboa 2007, Langenkamp 2000]. Die beiden Argumente beziehen sich jedoch auf unterschiedlich generierte Zellpopulatio-

nen, der Stellenwert der sequenziellen Stimulation in der Tumorthherapie mit DC ist nicht endgültig geklärt.

Mit der steigenden Anzahl und Größe klinischer Studien zur Immuntherapie mit DC haben die Ausbeute und die zuverlässige Funktion der Ausreifungsprotokolle – die Robustheit der Protokolle – an Bedeutung gewonnen [Trepiaikas 2008]. Zunehmend werden Zellen zur Durchführung der Studien kryokonserviert, erste Versuche mit kommerziellen Isolations- und Kultursystemen wurden in den letzten Jahren publiziert [Schuler-Thurner 2002, Feuerstein 2000, Berger 2005]. Jarnjak-Jankovich et al. konnten unter Verwendung kommerziell erhältlicher und für größere Patientenzahlen geeigneter Systeme zur Monozytenisolation und DC-Differenzierung und -Ausreifung *FastDC* generieren, die bezüglich der Expression von Reifemarkern auf ihrer Oberfläche und der Fähigkeit primäre T-Zellantworten zu erzeugen mit Standard-DC vergleichbar waren. Die verwendeten Monozyten stammten von Patienten mit fortgeschrittenem Prostatakarzinom [Jarnjak-Jankovic 2007]. *FastDC*, und besonders *IFN α FastDC* nach sequenzieller Stimulation, erscheinen vor diesem Hintergrund auch aufgrund ihrer Robustheit geeignet für den Einsatz in klinischen Studien.

4.10 Weiterführende Ansätze

Die durchgeführten Experimente zur Migration und Induktion peptidspezifischer zytotoxischer T-Zellen von *FastDC* im Vergleich zu *IFN α FastDC* und sequenziell stimulierten *FastDC* zeigen eine große Bandbreite der Fähigkeiten der verschiedenen DC-Populationen. Um die von *IFN α FastDC* erzeugten peptidspezifischen Immunantworten noch genauer zu charakterisieren ist vor allem die Beantwortung der Frage, wie *IFN α FastDC* die IL-12p70-Defizienz bei der Induktion von peptidspezifischen zytotoxischen T-Zellen umgehen von Bedeutung. Hier wäre, gerade im Hinblick auf die möglicherweise positive Wirkung auf das Überleben von CD8⁺-Gedächtnis-T-Zellen, eine weitergehende Analyse der IL-15-Expression interessant [Zhang 1998].

Betrachtet man das Modell der sequenziellen Stimulation als Anlehnung an die physiologische Situation, so bietet sich auch vor dem Hintergrund der antiapoptotischen Eigenschaften der CCR7-Liganden CCL19 und CCL21 deren zusätzliche Verwendung als Reifestimulus an (S.72) [Marsland 2005].

Martínez et al. konnten vor kurzem zeigen, dass eine Azidose im Kulturmedium die Ausreifung dendritischer Zellen fördert [Martínez 2007]. Neben der Verwendung verschiedener Vorläuferzellen, Isolationsmethoden, Medien, Zytokincocktails und – nachdem sich das *FastDC*-Protokoll in den letzten Jahren zunehmend etabliert hat – Zeitschemata übt also auch der pH-Wert des Kulturmediums Einfluss auf die Generierung dendritischer Zellen aus [Sakakibara 2006, Ramadan 2004, Jarnjak-Jankovic 2007, Alder 2006]. Möglicherweise wird dieser Ansatz, der zytokinfrei in Anlehnung an die bei einer Inflammation vorhandene Azidose die DC-Ausreifung unterstützt, in Zukunft *in vitro* zur Imitation physiologischer Verhältnisse, aber auch bei der Generierung von Vakzine-DC breitere Verwendung finden.

Die Vielfalt der Methoden zur Differenzierung und Ausreifung von DC birgt, wie auch im Rahmen dieser Arbeit deutlich wurde, mehrere Probleme: Neben den Schwierigkeiten, in anderen Arbeitsgruppen erfolgreich verwendete Protokolle zu reproduzieren wird der Vergleich verschieden generierter Zellen erheblich erschwert, wenn zu viele Variable eine Rolle spielen. Die von Schott geforderte Etablierung eines Standardprotokolles birgt die Gefahr, die Etablierung neuerer, möglicherweise überlegener Protokolle zu verzögern und die Anpassung der Protokolle an verschiedene Tumorentitäten zu verhindern [Schott 2006]. Ein Ansatz, der möglicherweise zur Klärung der Problematik beitragen kann wurde kürzlich von Luft et al. vorgestellt: Sogenannte *signal response modules* sind jeweils für die Aktivierung einer Eigenschaft der DC zuständig, die Aktivierung des Moduls geht von der Summe der auf die Zelle einwirkenden Stimuli aus [Luft 2006]. Die Klärung der Signalwege, die an der Aktivierung der jeweiligen Module beteiligt sind könnte eine systematische Analyse der verschiedenen Protokolle erlauben.

Ein weiteres Problem der aktuellen Forschung zur *in vitro* Generierung von DC ist die häufig sehr unterschiedliche Auswahl der Analyseverfahren. Hier wäre ein Konsens zwischen den verschiedenen Arbeitsgruppen sinnvoll und würde erheblich dazu beitragen die verschiedenen Protokolle reliabel bezüglich der Eigenschaften der DC zu vergleichen.

5 Zusammenfassung

DC sind entscheidend an der Entstehung einer adaptiven Immunantwort beteiligt. Mit ihrer Hilfe können zytotoxische-T-Zellreaktionen gegen maligne Tumore induziert werden. Die physiologischen Vorgänge bei der Entstehung einer Immunantwort durch DC sind noch nicht lückenlos geklärt. Es gibt eine Vielzahl an Protokollen zur *in vitro* Generierung von DC. Vor diesem Hintergrund soll die vorliegende Arbeit zum einen dazu beitragen, ein zur Tumorthherapie geeignetes Protokoll zur DC-Generierung zu entwickeln, zum anderen soll sie Einblicke in die Physiologie der DC ermöglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde anhand eines Protokolles zur Generierung von DC innerhalb von 48 Stunden der Einfluss eines $\text{IFN}\alpha$ -priming auf die Funktion von DC untersucht. $\text{IFN}\alpha$ hatte keinen Einfluss auf die Migration der Zellen, erhöhte jedoch die Kapazität zur Induktion antigenspezifischer CD8^+ T-Zellen bei Verwendung des Tumorantigens MART-1 als Modellpeptid. $\text{IFN}\alpha$ übt einen positiven Einfluss auf den Phänotyp und die Potenz zur Induktion antigenspezifischer CD8^+ T-Zellen durch DC aus. Die $\text{IFN}\alpha$ -Exposition von DC in frühen Phasen der Differenzierung entspricht mit hoher Wahrscheinlichkeit der Situation *in vivo* im Rahmen einer Inflammation und kann zur Herstellung vakzinegeeigneter DC *in vitro* genutzt werden.

In einem zweiten Schritt wurden $\text{IFN}\gamma$ und CD40L als T-Zell-abgeleitete Faktoren zur terminalen DC-Differenzierung verwendet. Die Migrationsfähigkeit der DC blieb unbeeinflusst, die sequenzielle Stimulation verbesserte die Potenz zur Induktion antigenspezifischer CD8^+ T-Zellen. Eine sequenzielle Stimulation eignet sich besonders, um DC für tumortherapeutische Zwecke zu generieren. Sie bietet die Möglichkeit, die CD4^+ T-Zell Anergie der Patienten zu umgehen. *In vitro* ermöglicht die sequen-

zielle Stimulation die Simulation des Verhaltens von DC nach dem Kontakt mit antigenspezifischen T-Zellen.

Eine dritte Versuchsreihe galt der Übertragung eines auf einer TLR-Stimulation basierenden, im konventionellen achttägigen Generierungsablauf dem Standardvorgehen möglicherweise überlegenen Ausreifungsprotokolles auf das 48 Stunden Konzept. Das Protokoll war nicht übertragbar, es konnten keine phänotypisch reifen, migrierenden DC generiert werden.

Literaturverzeichnis

- [Alder 2006] Alder J, Hahn-Zoric M, Andersson B, Karlsson-Parra A. Interferon- γ dose-dependently inhibits prostaglandin E₂-mediated dendritic-cell-migration towards secondary lymphoid organ chemokines. *Vaccine* 2006; 24: 7087-7094.
- [Alldawi 2005] Alldawi L, Takahashi M, Narita M, Ayres F, Tsukada N, Osman Y, Furukawa T, Aizawa Y. Effect of prostaglandin E₂, lipopolysaccharide, IFN- γ and cytokines on the generation and function of fast-DC. *Cytotherapy* 2005; 7: 195-202.
- [Alleva 1997] Alleva DG, Kaser SB, Monroy MA, Fenton MJ, Beller DI. IL-15 functions as a potent autocrine regulator of macrophage proinflammatory cytokine production. *J Immunol* 1997; 159: 2941-2951.
- [Altman 1996] Altman J, Moss P, Goulder P, Barouch D, McHeyzer-Williams M, Bell J, McMichael A, Davis M. Phenotypic analysis of antigen-specific T-lymphocytes. *Science* 1996; 274: 94-96.
- [Banchereau und Steinman 1998] Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-252.
- [Banchereau 2000] Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811.
- [Banchereau 2001] Banchereau J, Schuler-Thurner B, Palucka A, Schuler G. Dendritic cells as vectors for therapy. *Cell* 2001; 106: 271-275.
- [Banchereau und Palucka 2005] Banchereau J, Palucka K. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 296-306.
- [Baratt-Boyes 2000] Baratt-Boyes SM, Zimmer MI, Harshyne LA, Meyer EM, Watkins SC, Capuano III S, Murphey-Corb M, Falo Jr LD, Donnenberg AD. Maturation and trafficking of monocyte-derived dendritic cells in monkeys: implications for dendritic cell-based vaccines. *J Immunol* 2000; 164: 2487-2495.
- [Bennett 1998] Bennett S, Carbone F, Karmalis F, Flavell R, Miller J, Heath W. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 1998; 393: 478-480.
- [Berger 2005] Berger TG, Strasser E, Smith R, Carste C, Schuler-Thurner B, Kaempgen E, Schuler G. Efficient elutriation of monocytes in a closed system (ElutraTM) for clinical-scale generation of dendritic cells. *J Immunol Methods* 2005; 298: 61-72.

- [Betts 2003] Betts M, Brenchley J, Price D, De Rosa S, Douek D, Roederer M, Koup R. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* 2003; 281: 65-78.
- [Betts 2004] Betts M, Price D, Brenchley J, Loré K, Guenaga F, Smed-Sorensen A, Ambrozak D, Migueles S, Connors M, Roederer M, Douek D, Koup R. The functional profile of primary human antiviral CD8⁺ T cell effector activity is dictated by cognate peptide concentration. *J Immunol* 2004; 172: 6407-6417.
- [Blanco 2001] Blanco P, Palucka AK, Gill M, Pascual V, Banchereau J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus. *Science* 2001; 294: 1540-1543.
- [Blanco 2008] Blanco P, Palucka AK, Pascual V, Banchereau J. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008; 19: 41-52.
- [Blander und Medzhitov 2006] Blander JM, Medzhitov R. On regulation of phagosome maturation and antigen presentation. *Nat Immunol* 2006; 7: 1029-1035.
- [Blattman und Greenberg 2004] Blattman JN, Greenberg PD. Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. *Science* 2004; 305: 200-205.
- [le Bon 2003] le Bon A, Etchart N, Rossmann C, Ashton M, Hou S, Gewert D, Borrow P, Tough DF. Cross-priming of CD8⁺T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat Immunol* 2003; 4: 1009-1015.
- [Borden 2005] Borden EC. Milstein award lecture. Interferons and cancer: Where from here. *J Interferon Cytokine Res* 2005; 25: 511-527.
- [Bracci 2007] Bracci L, Proietti E, Belardelli F. IFN- α and novel strategies of combination therapy for cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1112: 256-268.
- [Brassard 2002] Brassard DL, Grace MJ, Borden RW. Interferon- α as an immunotherapeutic protein. *J Leukoc Biol* 2002; 71: 565-581.
- [Brunner 1968] Brunner K, Mauel J, Cerottini J, Chapuis B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ⁵¹Cr-labelled allogeneic target cells *in vitro*, inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* 1968; 14: 181-196.
- [Burkett 2005] Burkett M, Shafer-Weaver K, Strobl S, Baseler M, Malyguine A. A novel flow cytometric assay for evaluating cell-mediated cytotoxicity. *J Immunother* 2005; 28: 396-402.
- [Burnet 1957] Burnet FM. Cancer – a biological approach. *BMJ* 1957; 1: 841-847.
- [Caligiuri 2008] Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood* 2008; 112: 461-469.
- [Caux 1994] Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, van Kooten C, Durand I, Banchereau J. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 1994; 180: 1263-1272.

- [Caux 2002] Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Ait-Yahia S, Vaure C, Chemin K, Dieu-Nosjean MC, Vicari A. Regulation of dendritic cell recruitment by chemokines. *Transplantation* 2002; 73: 7-11.
- [Cella 1996] Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, 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* 1996; 184: 747-752.
- [Cella 1997] Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 1997; 388: 782-787.
- [Chan 2006] Chan CW, Crafton E, Fan HN, Flook J, Yoshimura K, Skarica M, Brocksedt D, Dubensky TW, Stins MF, Lanier LL, Pardoll DM, Housseau F. Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat Med* 2006; 12: 207-213.
- [Clay 2001] Clay T, Hobeika A, Mosca P, Lyerly H, Morse M. Assays for monitoring cellular immune responses to active immunotherapy of cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1127-1135.
- [Constant und Bottomly 1997] Constant S, Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4⁺T cell responses: The alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 297-322.
- [Coquerelle und Moser 2008] Coquerelle C, Moser M. Are dendritic cells central to regulatory T cell function? *Immunol Lett* 2008; 119: 12-16.
- [Crocì 2007] Crocì D, Zacharías Fluck M, Rico M, Matar P, Rabinovich G, Scharovsky O. Dynamic cross talk between tumor and immune cells in orchestrating the immunosuppressive network at the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56: 1687-1700.
- [Curiel 2004] Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conjeo-Garcia JR, Zhang L, Burrow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004; 9: 942-949.
- [Czerniecki 2007] Czerniecki BJ, Koski GK, Kolodovsky U, Xu S, Cohen PA, Mick R, Nisenbaum H, Pasha T, Xu M, Fox KR, Weinstein S, Orel SG, Vonderheide R, Coukos G, DeMichele A, Araujo L, Spitz FR, Rosen M, Levine BL, June C, Zhang PJ. Targeting HER-2/*neu* in early breast cancer development using dendritic cells with staged interleukin-12 burst secretion. *Cancer Res* 2007; 67: 1842-1852.
- [Dantal und Soulillou 2005] Dantal J, Soulillou JP. Immunosuppressive drugs and the risk of cancer after organ transplantation. *N Engl J Med* 2005; 352: 1371-1373.
- [Darnell 2004] Darnell RB. Paraneoplastic neurologic disorders: Windows into neuronal function and tumor immunity. *Arch Neurol* 2004; 61: 30-32.

- [Dauer 2003] Dauer M, Pohl K, Obermaier B, Meskendahl T, Röbe J, Schnurr M, Endres S, Eigler A. Interferon- α disables dendritic cell precursors: dendritic cells derived from interferon- α -treated monocytes are defective in maturation and T-cell stimulation. *Immunol* 2003; 110: 38-47.
- [Dauer 2003a] Dauer M, Obermaier B, Herten J, Haerle C, Pohl K, Rothenfusser S, Schnurr M, Endres S, Eigler A. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: A novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *J Immunol* 2003; 170: 4069-4076.
- [Dauer 2005] Dauer M, Schad K, Herten J, Junkmann J, Bauer C, Kiehl R, Endres S, Eigler A. *FastDC* derived from human monocytes within 48h effectively prime tumor antigen-specific cytotoxic T cells. *J Immunol Meth* 2005; 302: 145-155.
- [Dauer 2006] Dauer M, Schad K, Junkmann J, Bauer C, Herten J, Kiehl R, Schnurr M, Endres S, Eigler A. IFN α promotes definitive maturation of dendritic cells generated by short-term culture of monocytes with GM-CSF and IL4. *J Leucoc Biol* 2006; 80: 278-286.
- [Della Bella 2004] Della Bella S, Nicola S, Riva A, Biasin M, Clerici M, Villa ML. Functional repertoire of dendritic cells generated in granulocyte macrophage-colony stimulating factor and interferon-alpha. *J Leucoc Biol* 2004; 75: 106-116.
- [Devèvre 2006] Devèvre E, Romero P, Mahnke Y. LiveCount Assay: Concomitant measurement of cytolytic activity and phenotypic characterisation of CD8⁺ T-cells by flow cytometry. *J Immunol Meth* 2006; 311: 31-46.
- [Dhodapkar 2001] Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effektor T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 2001; 193: 233-238.
- [Dubois 2002] Dubois S, Mariner J, Waldmann TA, Tagaya Y. IL-15R α recycles and presents IL-15 in *trans* to neighboring cells. *Immunity* 2002; 17: 537-547.
- [Dunn 2004] Dunn GP, Lloyd JO, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004; 21: 137-148.
- [Dutoit 2002] Dutoit V, Rubio-Godoy V, Doucey MA, Batard P, Liénard D, Rimoldi D, Speiser D, Guillaume P, Cerottini JC, Romero P, Valmori D. Functional avidity of tumor antigen-specific CTL recognition directly correlates with the stability of MHC/Peptide multimer binding to TCR. *J Immunol* 2002; 168: 1167-1171.
- [Egle 1996] Egle A, Villunger A, Kos M, Bock G, Gruber J, Auer B, Greil R. Modulation of Apo-1/FAS (CD95)-induced programmed cell death in myeloma cells by interferon-alpha2. *Eur J Immunol* 1996; 26: 3119-3126.
- [Ehrlich 1909] Ehrlich P. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneeskde* 1909; 5: 273-290.
- [Eklund und Kuzel 2005] Eklund JW, Kuzel TM. Denileukin difitox: a concise clinical review. *Expert Rev Anticancer Ther* 2005; 5: 33-38.

- [Fehniger 2002] Fehniger TA, Cooper MA, Caligiuri MA. Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13: 169-183.
- [Feuerstein 2000] Feuerstein B, Berger T, Maczek C, Röder C, Schreiner D, Hirsch U, Haendle I, Leisgang W, Glaser A, Kuss O, Diepgen T, Schuler G, Schuler-Thurner B. A method for the production of cryopreserved aliquots of antigen-preloaded, mature dendritic cells ready for clinical use. *J Immunol Meth* 2000; 245: 15-29.
- [Figdor 2004] Figdor C, de Vries J, Lesterhuis W, Melief C. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med* 2004; 10: 475-480.
- [Finn 2008] Finn OJ. Cancer Immunology. *N Engl J Med* 2008; 358: 2704-2715.
- [Fitzgerald-Bocarsly 1993] Fitzgerald-Bocarsly P. Human natural interferon alpha producing cells. *Pharmacol Ther* 1993; 60: 39-62.
- [Förster 1999] Förster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Müller I, Wolf E, Lipp M. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 1999; 99: 23-33.
- [Förster 2008] Förster R, Davalos-Misslitz AC, Rot A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 362-371.
- [Fong 2001] Fong L, Hou Y, Rivas A, Benike C, Yuen A, Fisher G, Davis M, Engleman E. Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 8809-8814.
- [Gabrilovich 1996] Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 1996; 2: 1096-1103.
- [Galon 2006] Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pagès F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313: 1960-1964.
- [Garg 2003] Garg S, Oran A, Wajchmann J, Sasaki S, Maris CH, Kapp JA, Jacob J. Genetic tagging shows increased frequency and longevity of antigen-presenting, skin-derived dendritic cells in vivo. *Nat Immunol* 2003; 9: 907-912.
- [O'Garra 1998] O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 1998; 8: 275-283.
- [Gately 1998] Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, Presky DH. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: Role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 495-521.
- [Gauzzi 2002] Gauzzi M, Canini I, Eid P, Belardelli F, Gessani S. Loss of type I interferon receptors and impaired IFN responsiveness during terminal maturation of monocyte-derived human dendritic cells. *J Immunol* 2002; 169: 3038-3045.

- [Gilboa 2007] Gilboa E. DC-based cancer vaccines. *J Clin Invest* 2007; 117: 1195-1203.
- [Ginhoux 2006] Ginhoux F, Tacke F, Angeli V, Bogunovic M, Loubreau M, Dai X, Stanley E, Randolph G, Merad M. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol* 2006; 7: 265-273.
- [Glue 2000] Glue P, Fang JW, Rouzier-Panis R, Raffanel C, Sabo R, Gupta SK, Salfi M, Jacobs S. Pegylated interferon-alpha2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficiency data. Hepatitis C intervention therapy group. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 68: 556-567.
- [Goeddel 1981] Goeddel DV, Yelverton E, Ullrich A, Heyneker HL, Miozzari G, Holmes W, Seeburg PH, Dull T, May L, Stebbing N, Crea R, Maeda S, McCandliss R, Sloma A, Tabor JM, Gross M, Familletti PC, Pestka S. Human leukocyte interferon produced by *E. coli* is biologically active. *Nature* 1981; 287: 411-416.
- [Goepfert 2000] Goepfert P, Bansal A, Edwards B, Ritter G, Tellez I, McPherson S, Sabbaj S, Mulligan M. A significant number of human immunodeficiency virus epitope-specific cytotoxic T-lymphocytes detected by tetramer binding do not produce gamma-interferon. *J Virol* 2000; 74: 10249-10255.
- [Gotch 1987] Gotch F, Rothbard J, Howland K, Townsend A, McMichael A. Cytotoxic T-lymphocytes recognize a fragment of influenza virus matrix protein in association with HLA-A2. *Nature* 1987; 336: 881-882.
- [Gresser 1969] Gresser I, Bourall C, Levy JP, Fontaine-Brouty-Boye D, Thomas MT. Increased survival in mice inoculated with tumor cells and treated with interferon preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1969; 63: 51-57.
- [Guinn 2007] Guinn B, Kasahara N, Farzaneh F, Habib NA, Norris JS, Deisseroth AB. Recent advances and current challenges in tumor immunology and immunotherapy. *Molecular Therapy* 2007; 15: 1065-1071.
- [Gunn 1999] Gunn MD, Kyuwa S, Tam C, Kakiuchi T, Matsuzawa A, Williams LT, Nakano H. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med* 1999; 189: 451-460.
- [Heystek 2003] Heystek H, den Drijver B, Kapsenberg M, van Lier R, de Jong E. Type I IFNs differentially modulate IL-12p70 production by human dendritic cells depending on the maturation status of the cells and counteract IFN- γ -mediated signalling. *Clinical Immunol* 2003; 107: 170-177.
- [Hsieh 1993] Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* 1993; 260: 547-548.
- [Hsu 1996] Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engleman EG, Levy R. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1996; 2: 52-58.

- [Iezzi 1999] Iezzi G, Scotet E, Scheidegger D, Lanzavcechia A. The interplay between the duration of TCR and cytokine signalling determines T cell polarization. *Eur J Immunol* 1999; 29: 4092-4101.
- [Isaacs und Lindenmann 1957] Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. 1. The interferon. *Proc R Soc Lond [Biol]* 1957; 147: 258-267.
- [Janeway und Medzhitov 2002] Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Ann Rev Immunol* 2002; 20: 197-216.
- [Janssen 2003] Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, von Herrath MG, Schoenberger SP. CD4⁺T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺T lymphocytes. *Nature* 2003; 421: 852-856.
- [Jarnjak-Jankovic 2007] Jarnjak-Jankovic S, Hammerstad H, Sæbøe-Larssen S, Kvalheim G, Gaudernack G. A full scale comparative study of methods for generation of functional dendritic cells for use as cancer vaccines. *BMC Cancer* 2007; 7: 119.
- [Jonuleit 1997] Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, Enk A. Pro-Inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum free conditions. *Eur J Immunol* 1997; 27: 3135-3142.
- [Jonuleit 2001] Jonuleit H, Giesecke-Tüttenberg A, Tütting T, Schuler-Thurner B, Stuge T, Paragnik L, Kandemir A, Lee P, Schuler G, Knop J, Enk A. A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. *Int J Cancer* 2001; 93: 243-251.
- [Jung 1993] Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1993; 159: 197-207.
- [Kalinski 1999] Kalinski P, Schuitemaker J, Hilkens C, Wierenga E, Kapsenberg M. Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN γ and to bacterial IL-12 inducers: Decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. *J Immunol* 1999; 162: 3231-3236.
- [Kalinski 1999a] Kalinski P, Hilkens CMU, Wierenga EA, Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 1999; 20: 561-567.
- [Kalinski 2001] Kalinski P, Vieira P, Schuitemaker J, de Jong E, Kapsenberg M. Prostaglandin E₂ is a selective inducer of interleukin-12p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer. *Blood* 2001; 97: 3466-3469.
- [Knabel 2002] Knabel M, Franz T, Schiemann M, Wulf A, Villmow B, Schmidt B, Bernhard H, Wagner H, Busch D. Reversible MHC multimer staining for functional isolation of T-cell populations and effective adoptive transfer. *Nat Med* 2002; 8: 631-637.
- [Kondo 1994] Kondo S, Asano M, Matsuo K, Ohmori I, Suzeki H. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is detectable in the sera of tumor-bearing mice and cancer patients. *Biochem Biophys Acta* 1994; 1221: 211-214.

- [van Kooten und Banchereau 2000] van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 2000; 67: 2-17.
- [Kuchroo 1995] Kuchroo VK, Das MP, Brown JA, Ranger AM, Zamvil SS, Sobel RA, Weiner HL, Nabavi N, Glimcher LH. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 1997; 80: 707-718.
- [Kuniyoshi 1999] Kuniyoshi JS, Kuniyoshi CJ, Lim AM, Wang FY, Bade ER, Lau R, Thomas EK, Weber JS. Dendritic cell secretion of IL-15 is induced by recombinant huCD40LT and augments the stimulation of antigen-specific cytolytic T cells. *Cell Immunol* 1999; 193: 48-58.
- [Langenkamp 2000] Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of Th1, Th2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* 2000; 1: 311-316.
- [Lechmann 2002] Lechmann M, Zinser E, Golka A, Steinkasserer A. Role of CD83 in the immunomodulation of dendritic cells. *Int arch Allergy Immunol* 2002; 129: 113-118.
- [Lee 2002] Lee AW, Truong T, Bickham K, Fontenau JF, Larsson M, da Silva I, Somersan S, Thomas EK, Bhardwaj N. A clinical grade cocktail of cytokines and PGE₂ results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine* 2002; 20: 8-22.
- [Lee und Iwasaki 2007] Lee HK, Iwasaki A. Innate control of adaptive immunity: Dendritic cells and beyond. *Semin Immunol* 2007; 19: 48-55.
- [Lee 2008] Lee J, Foon K, Mailliard R, Muthuswamy R, Kalinski P. Type 1-polarized dendritic cells loaded with autologous tumor are a potent immunogen against chronic lymphocytic leukemia. *J Leukoc Biol* 2008; 84: 319-325.
- [Lee 1999] Lee P, Yee C, Savage P, Fong L, Brockstedt D, Weber J, Johnson D, Swetter S, Thompson J, Greenberg P, Roederer M, Davis M. Characterization of circulating T cells specific for tumor associated antigens in melanoma patients. *Nature Med* 1999; 6: 677-685.
- [Legler 2006] Legler DF, Krause P, Scandella E, Singer E, Groettrup M. Prostaglandin E₂ is generally required for human dendritic cell migration and exerts its effect via EP2 and EP4 receptors. *J Immunol* 2006; 176: 966-973.
- [Lehner 2008] Lehner M, Stilper A, Morhart P, Holter W. Plasticity of dendritic cell function in response to prostaglandin E₂ (PGE₂) and interferon γ (IFN γ). *J Leukoc Biol* 2008; 83: 883-893.
- [Lindahl 1976] Lindahl P, Gresser I, Leary P, Tovey M. Interferon treatment of mice: Enhanced expression of histocompatibility antigens on lymphoid cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 1976; 73: 1284-1287.
- [Ling 1995] Ling P, Gately MK, Gubler U, Stern AS, Lin P, Hollfelder K, Su C, Pan YCE, Hakimi J. Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity. *J Immunol* 1995; 154: 116-127.

- [Liyanage 2002] Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA, Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS, Linehan DC. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 2002; 169: 2756-2761.
- [Ludewig 2001] Ludewig B, McCoy K, Ochsenbein AF, Dumrese T, Odermatt B, Toes RE, Melief CJ, Hengartner H, Zinkernagel RM. Rapid peptide turnover and inefficient presentation of exogenous antigen critically limit the activation of self reactive CTL by dendritic cells. *J Immunol* 2001; 166: 3678-3687.
- [Luft 1998] Luft T, Pang KC, Thomas E, Hertzog P, Hart DNJ, Trapani J, Cebon J. Type I Interferons enhance the terminal differentiation of dendritic cells. *J Immunol* 1998; 161: 1947-1953.
- [Luft 2002] Luft T, Jefford M, Luetjens P, Toy T, Hochrein H, Masterman K, Maliszewski C, Shortman K, Cebon J, Maraskovsky E. Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E2 regulates the migratory capacity of specific DC subsets. *Blood* 2002; 100: 1362-1372.
- [Luft 2002a] Luft T, Luetjens P, Hochrein H, Toy T, Masterman K, Rizkalla M, Maliszewski C, Shortman K, Cebon J, Maraskovsky E. IFN- α enhances CD40 ligand mediated activation of immature monocyte-derived dendritic cells. *Int Immunol* 2002; 14: 367-380.
- [Luft 2004] Luft T, Maraskovsky E, Schnurr M, Knebel K, Kirsch M, Görner M, Skoda R, Ho A, Nawroth P, Bierhaus A. Tuning the volume of the immune response: strength and persistence of stimulation determine migration and cytokine secretion of dendritic cells. *Blood* 2004; 104: 1066-1074.
- [Luft 2006] Luft T, Rodionova E, Maraskovsky E, Kirsch M, Hess M, Buchholtz C, Goerner M, Schnurr M, Skoda R, Ho A. Adaptive functional differentiation of dendritic cells: integrating the network of extra- and intracellular signals. *Blood* 2006; 107: 4763-4769.
- [Mackensen 1997] Mackensen A, Veelken H, Lahn M, Wittnebel S, Becker D, Kohler G, Kulmburg P, Brennscheidt U, Rosenthal F, Franke B, Mertelsmann R, Lindemann A. Induction of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes by immunization with autologous tumor cells and interleukin-2 gene transfected fibroblasts. *J Mol Med* 1997; 75: 290-296.
- [Mahnke 2002] Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Enk A, Jonuleit H. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 2002; 80: 477-483.
- [Mailliard 2003] Mailliard R, Son Y, Redlinger R, Coates P, Giermasz A, Morel P, Storkus W, Kalinski P. Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: Two-signal requirement for the induction of NK cell helper function. *J Immunol* 2003; 171: 2366-2373.

- [Mailliard 2004] Mailliard R, Wankowicz-Kalinska A, Cai Q, Wesa A, Hilkens C, Kapsenberg M, Kirkwood J, Storkus W, Kalinski P. Alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. *Cancer Res* 2004; 64: 5934-5937.
- [Marsland 2005] Marsland BJ, Bättig P, Bauer M, Ruedl C, Lässig U, Beerli R, Dietmeier K, Ivanova L, Pfister T, Vogt L, Nakano H, Nembrini C, Saudan P, Kopf M, Bachmann MF. CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells. *Immunity* 2005; 22: 493-505.
- [Martín-Fontecha 2003] Martín-Fontecha A, Sebastiani S, Höpken UE, Ugucioni M, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: Impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med* 2003; 198: 615-621.
- [Martínez 2007] Martínez D, Vermeulen M, von Euw E, Sabatté J, Maggíni J, Ceballos A, Trevani A, Nahmod K, Salamone G, Barrio M, Giordano M, Amigorena S, Geffner J. Extracellular acidosis triggers the maturation of human dendritic cells and the production of IL-12. *J Immunol* 2007; 179: 1950-1959.
- [McRae 1998] McRae B, Tolouei Semnani R, Hayes M, Seventer G. Type I interferons inhibit human dendritic cell IL-12 production and Th1 cell development. *J Immunol* 1998; 160: 4298-4304.
- [McRae 2000] McRae B, Nagai T, Tolouei Semnani R, van Seventer JM, van Seventer GA. Interferon- α and - β inhibit the in vitro differentiation of immunocompetent human dendritic cells from CD14⁺ precursors. *Blood* 2000; 96: 210-217.
- [Mittendorf 2005] Mittendorf EA, Storrer CE, Shriver CD, Ponniah S, Peoples GE. Evaluation of the CD107 cytotoxicity assay for the detection of cytolytic CD8⁺ cells recognizing HER2/*neu* vaccine peptides. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 92: 85-93.
- [Miyatake 2007] Miyatake H, Kanto T, Inoue M, Sakakibara M, Kaimori A, Yakushijin T, Itose I, Miyazaki M, Kuzushita N, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Impaired ability of interferon-alpha-primed dendritic cells to stimulate Th1-type CD4 T-cell response in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2007; 14: 404-412.
- [Morse 1999] Morse MA, Coleman RE, Akabani G, Niehaus N, Coleman D Lyerly HK. Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic melanoma. *Cancer Res* 1999; 59: 56-58.
- [Mosmann 1986] Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffmann RL. Two types of murine helper T cell clone I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136: 2348-2357.
- [Mohty 2003] Mohty M, Vialle-Castellano A, Nunes J, Isnardon D, Olive D, Gaugler B. IFN- α skews monocyte differentiation into toll-like receptor 7-expressing dendritic cells with potent functional activities. *J Immunol* 2003; 171: 3385-3393.

- [Murphy 2001] Murphy D, Detjen KM, Welzel M, Wiedenmann B, Rosewicz S. Interferon-alpha delays S-phase progression in human hepatocellular carcinoma cells via inhibition of specific cyclin-dependent kinases. *Hepatology* 2001; 33: 346-356.
- [O'Neill 2004] O'Neill D, Adams S, Bhardwaj N. Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. *Blood* 2004; 104: 2235-2246.
- [Nestle 1998] Nestle FO; Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998; 4: 328-332.
- [Nishimura 2000] Nishimura T, Nakui M, Sato M, Iwakabe K, Kitamura H, Sekimoto M, Ohta A, Koda T, Nishimura S. The critical role of Th1-dominant immunity in tumor immunology. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000; 46: 53-61.
- [Ogg 1998] Ogg G, Jin X, Bonhoeffer S, Dubar P, Nowack M, Monard S, Segal J, Cao Y, Rowland-Jones S, Cerundolo V, Hurley A, Markowitz M, Ho D, Nixon D, McMichael A. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* 1998; 279: 2103-2106.
- [Ohl 2004] Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, Hintzen G, Kiafard Z, Zwirmer J, Blankenstein T, Henning G, Forster R. CCR7 governs skin dendritic cell under inflammatory and steady-state condition. *Immunity* 2004; 21: 279-288.
- [Papewalis 2008] Papewalis C, Jacobs B, Wuttke M, Ullrich E, Baehring T, Fenk R, Wilenberg H, Schinner S, Cohnen M, Seissler J, Zacharowski K, Scherbaum W, Schott M. IFN- α skews monocytes into CD56⁺-expressing dendritic cells with potent functional activities in vitro and in vivo. *J Immunol* 2008; 180: 1462-1470.
- [Pardoll 2002] Pardoll DM. Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 227-238.
- [Parlato 2001] Parlato S, Santini S, Lapenta C, Di Pucchio T, Logozzi M, Spada M, Giammarioli A, Malorni W, Fais S, Belardelli F. Expression of CCR-7, MIP-3 β , and Th-1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells: importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities. *Blood* 2001; 98: 3022-3029.
- [Perabo und Müller 2004] Perabo FGE, Müller SC. Current and new strategies in immunotherapy for superficial bladder cancer. *Urology* 2004; 64: 409-421.
- [Phan 2003] Phan GQ, Yang JC, Sherry RM, Hwu P, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Restifo NP, Haworth LR, Seipp CA, Freezer LJ, Morton KE, Mavroukakis SA, Duray PH, Steinberg SM, Allison JP, Davis TA, Rosenberg SA. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *PNAS* 2003; 100: 8372-8377.
- [Picker 1995] Picker LJ, Singh MK, Zdraveski Z, Treer JR, Waldrop SL, Bergstresser PR, Maino VC. Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry. *Blood* 1995; 86: 1408-1419.

- [Pulendran 2001] Pulendran B, Palucka K, Banchereau J. Sensing pathogens and tuning immune responses. *Science* 2001; 293: 253-256.
- [Rabinovich 2007] Rabinovich G, Gabrilovich D, Sotomayor E. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 267-296.
- [Radvanyi 1999] Radvanyi LG, Banerjee A, Weir M, Messner H. Low levels of interferon- α induce CD86 (B7.2) expression and accelerates dendritic cell maturation from human peripheral blood mononuclear cells. *Scan J Immunol* 1999; 50: 499-509.
- [Ramadan 2004] Ramadan G, Konings S, Kurup VP, Keever-Taylor CA. Generation of Aspergillus- and CMV- specific T-cell responses using autologous fast DC. *Cytotherapy* 2004; 6: 223-234.
- [Randolph 1998] Randolph GJ, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 1998; 282: 480-483.
- [Ridge 1998] Ridge J, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 1998; 393: 474-478.
- [Riol-Blanco 2005] Riol-Blanco L, Sánchez-Sánchez N, Torres A, Tejedor A, Narumija S, Corbi A, Sanchez-Mateos P, Rodríguez-Fernandez J. The chemokine receptor CCR7 stimulates two signaling pathways that independently modulate chemotaxis and migratory speed of dendritic cells. *J Immunol* 2005; 174: 4070-4080.
- [Rosenberg 2004] Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 2004; 10: 909-915.
- [Rossi und Young 2005] Rossi M, Young J. Human dendritic cells: Potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol* 2005; 175: 1373-1381.
- [Rothenfusser 2004] Rothenfusser S, Hornung V, Ayyoub M, Britsch S, Towarowski A, Krug A, Sarris A, Lubenow N, Speiser D, Endres S, Hartmann G. CpG-A and CpG-B oligonucleotides differentially enhance human peptide-specific primary and memory CD8⁺T-cell responses in vitro. *Blood* 2004; 103: 2162-2169.
- [Royer 2006] Royer PJ, Tanguy-Royer S, Ebstein F, Sapede C, Simon T, Barbieux I, Oger R, Gregoire M. Culture medium and protein supplementation in the generation and maturation of dendritic cells. *Scand J Immunol* 2006; 63: 401-409.
- [Rubio 2003] Rubio V, Stuge T, Singh N, Betts M, Weber J, Roederer M, Lee P. Ex vivo identification, isolation and analysis of tumorlytic T cells. *Nat Med* 2003; 9: 1377-1382.
- [Sakakibara 2006] Sakakibara M, Kanto T, Inoue M, Kaimori A, Yakushijin T, Miyatake H, Itose I, Miyazaki M, Kuzushita N, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Quick generation of fully mature dendritic cells from monocytes with OK432,

- low-dose prostanoid, and interferon- α as potent immune enhancers. *J Immunother* 2006; 29: 67-77.
- [Sallusto und Lanzavecchia 1994] Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J exp med* 1994; 179: 1109-1119.
- [Sallusto 2000] Sallusto F, Mackay C, Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 593-620.
- [Salter 1985] Salter RD, Howell DN, Cresswell P. Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics* 1985; 21: 235-246.
- [Sánchez-Sánchez 2006] Sánchez-Sánchez N, Riol-Blanco L, Rodríguez-Fernández JL. The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells. *J Immunol* 2006; 176: 5153-5159.
- [Santini 2000] Santini S, Lapenta C, Logozzi M, Parlato S, Spada M, Di Pucchio T, Bellardelli F. Type I interferons as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL SCID mice. *J Exp Med* 2000; 191: 1777-1788.
- [Scandella 2002] Scandella E, Men Y, Gillessen S, Förster R, Groettrup M. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2002; 100: 1354-1361.
- [Schad 2008] Schad K. Generierung dendritischer Zellen *in vitro* innerhalb von 48 Stunden: Optimierung des Reifungsprotokolls und Induktion einer Antigen-spezifischen Immunantwort. *Medizinische Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München; 2008.*
- [Schadendorf 2006] Schadendorf D, Ugurel S, Schuler-Thurner B, Nestle FO, Enk A, Bröcker EB, Grabbe S, Rittgen W, Edler L, Sucker A, Zimpfer-Rechner C, Berger T, Kamarashev J, Burg G, Jonuleit H, Tüttenberg A, Becker JC, Keikavoussi P, Kämpgen E, Schuler G. Dacarbazine (DITC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG. *Ann Oncol* 2006; 17: 563-570.
- [Schnurr 2003] Schnurr M, Toy T, Stoitzner P, Cameron P, Shin A, Beecroft T, Davis I, Cebon J, Maraskovsky E. ATP gradients inhibit the migratory capacity of specific human dendritic cell types: implications for P2Y11 receptor signaling. *Blood* 2003; 14: 105-110.
- [Schnurr 2005] Schnurr M, Toy T, Shin A, Wagner M, Cebon J, Maraskovsky E. Extracellular nucleotide signaling by P2 receptors inhibits IL-12 and enhances IL-23 expression in human dendritic cells: a novel role for the cAMP pathway. *Blood* 2005; 105: 1582-1589.

- [Schott 2006] Schott M. Immunosurveillance by dendritic cells: potential implication for immunotherapy of endocrine cancers. *Endocrine-Related Cancer* 2006; 13: 779-795.
- [Schuler 2003] Schuler G, Schuler-Thurner B, Steinman R. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Current Opinion in Immunology* 2003; 15: 138-147.
- [Schuler-Thurner 2002] Schuler-Thurner B, Schultz ES, Berger TG, Weinlich G, Ebner S, Woerl P, Bender A, Feuerstein B, Fritsch PO, Romani N, Schuler G. Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells. *J Exp Med* 2002; 195: 1279-1288.
- [Serhan 1996] Serhan CN, Haeggström JZ, Leslie C. Lipid mediator networks in cell signaling: update and impact of cytokines. *FASEB J* 1996; 10: 1147-1158.
- [Shedlock und Shen 2003] Shedlock DJ, Shen H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 2003; 300: 337-339.
- [Shortman und Liu 2002] Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 151-161.
- [Sidky und Borden 1987] Sidky YA, Borden EC. Inhibition of angiogenesis by interferons: effects on tumor- and lymphocyte-induced vascular responses. *Cancer Res* 1987; 47: 5155-5161.
- [Siegal 1999] Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. The nature of the principal type I interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999; 284: 1835-1837.
- [Snijders 1998] Snijders A, Kalinski P, Hilkens C, Kapsenberg M. High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *Int Immunol* 1998; 10: 1593-1598.
- [Sozanni 1998] Sozanni S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, Imai T, Yoshie O, Bonecchi R, Mantovani A. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* 1998; 161: 1083-1086.
- [Steinman und Nussenzweig 2002] Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: The importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *PNAS* 2002; 99: 351-358.
- [Steinman 2003] Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 685-711.
- [Steinman und Banchereau 2007] Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 2007; 449: 419-426.
- [Taieb 2006] Taieb J, Chaput N, Ménard C, Apetoh E, Ullrich E, Bonmort M, Péquignot M, Casares N, Terme M, Flament C, Opolon P, Lecluse Y, Métivier D, Tomasello E, Vievier E, Ghiringhelli F, Martin F, Klatzmann D, Poynard T, Tursz T, Raposo G, Yagita H, Ryffel B, Kroemer G, Zitvogel L. A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat Med* 2006; 12: 214-219.

- [Tanaka 2006] Tanaka F, Yamaguchi H, Haraguchi N, Mashino K, Ohta M, Inoue H, Mori M. Efficient induction of specific cytotoxic T lymphocytes to tumor rejection peptide using functional matured 2 day-cultured dendritic cells derived from human monocytes. *Int J Oncol* 2006; 29: 1263-1268.
- [Tanaka 2000] Tanaka H, Demeure CE, Rubio M, Delespesse G, Sarfati M. Human monocyte-derived dendritic cells induce naive T cell differentiation into T helper cell type 2 (Th2) or Th1/Th2 effectors: Role of stimulator/responder ratio. *J Exp Med* 2000; 192: 405-411.
- [Tatsumi 2002] Tatsumi T, Kierstead LS, Ranieri E, Gesualdo L, Schena FP, Finke JH, Bukowski RM, Mueller-Berghaus J, Kirkwood JM, Kwok WW, Storkus WJ. Disease-associated bias in T helper type 1 (TH1)/TH2 CD4⁺T cell responses against MAGE-6 in HLA-DRB1*0401⁺ patients with renal cell carcinoma or melanoma. *J Exp Med* 2002; 196: 619-628.
- [Thurnher 2001] Thurnher M, Zelle-Rieser C, Ramoner R, Bartsch G, Hörtl L. The disabled dendritic cell. *FASEB J* 2001; 15: 1054-1061.
- [Toldbod 2003] Toldbod HE, Agger R, Bolund L, Hokland M. Potent influence of bovine serum proteins in experimental dendritic cell-based vaccination protocols. *Scand J Immunol* 2003; 58: 43-50.
- [Tosi 2004] Tosi D, Valenti R, Cova A, Sovena G, Huber V, Pilla L, Arienti F, Belardelli F, Parmiani G, Rivoltini L. Role of cross-talk between IFN- α -induced monocyte-derived dendritic cells and NK cells in priming CD8⁺ T cell responses against human tumor antigens. *J Immunol* 2004; 172: 5363-5370.
- [Tough 1996] Tough DF, Borrow P, Sprent J. Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I Interferon in vivo. *Science* 1996; 272: 1947-1950.
- [Tough 2004] Tough DF. Type I Interferon as a link between innate and adaptive immunity through dendritic cell stimulation. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 257-264.
- [Trapani und Smyth 2002] Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the Perforin/Granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 735-747.
- [Trepiaikas 2008] Trepiaikas R, Pedersen A, Met Ö, Hansen M, Berntsen A, Svane I. Comparison of α -Type-1 polarizing and standard dendritic cell cytokine cocktail for maturation of therapeutic monocyte-derived dendritic cell preparations from cancer patients. *Vaccine* 2008; 26: 2824-2832.
- [Trinchieri 1995] Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridges innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 251-276.
- [Trinchieri 2003] Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 133-146.
- [Ueno 2007] Ueno H, Klechevsky E, Morita R, Asford C, Cao T, Matsui T, Di Pucchio T, Conolly J, Fay JW, Pascual V, Palucka AK, Banchereau J. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev* 2007; 219: 118-142.

- [Valitutti 1996] Valitutti S, Müller S, Dessing M, Lanzavecchia A. Different responses are elicited in cytotoxic T lymphocytes by different levels of T cell receptor occupancy. *J Exp Med* 1996; 183: 1917-1923.
- [Valmori 1998] Valmori D, Fonteneau JF, Lizana C, Gervois N, Liénard D, Rimoldi D, Jongeneel V, Jotereau F, Cerottini JC, Romero P. Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues. *J Immunol* 1998; 160: 1750-1758.
- [del Vecchio 2007] del Vecchio M, Bajetta E, Canova S, Lotze MT, Wesa A, Parmiani G, Anichini A. Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 4677-4685.
- [de Vries 2003] de Vries J, Kroonshoop D, Scharenborg N, Lesterhuis W, Diepstra J, van Muijen G, Strijk S, Ruers T, Boermann O, Oyen W, Adema G, Punt C, Figdor C. Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state. *Cancer Res* 2003; 63: 12-17.
- [Waldmann 2006] Waldmann T. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: Implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 595-601.
- [Walzer 2005] Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* 2005; 106: 2252-2258.
- [Wan 2001] Wan Y, Lu L, Bramson J, Baral S, Zhu Q, Pilon A, Dayball K. Dendritic cell-derived IL-12 is not required for the generation of cytotoxic, IFN- γ -secreting, CD8⁺ CTL in vivo. *J Immunol* 2001; 167: 5027-5033.
- [Whelan 1999] Whelan J, Dunbar P, Price D, Purbhoo M, Lechner F, Ogg G, Griffith G, Phillips R, Cerundolo V, Sewell A. Specificity of CTL interactions with Peptide-MHC class I tetrameric complexes is temperature dependent. *J Immunol* 1999; 163: 4342-4348.
- [Xu 2003] Xu S, Koski G, Bedrosian I, Mick R, Maeurer M, Cheever M, Cohen P, Czerwiecki B. Rapid high efficiency sensitization of CD8⁺T cells to tumor antigens by dendritic cells leads to enhanced functional avidity and direct tumor recognition through an IL-12-dependent mechanism. *J Immunol* 2003; 171: 2251-2261.
- [Yamaji 2006] Yamaji K, Nabeshima S, Murata M, Chong Y, Furusyo N, Ikematsu H, Hayashi J. Interferon- α/β upregulate IL-15 expression in vitro and in vivo: analysis in human hepatocellular carcinoma cell lines and in chronic hepatitis C patients during interferon- α/β treatment. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 394-403.
- [Yanagawa und Onoe 2002] Yanagawa Y, Onoe K. CCL19 induces rapid dendritic extension of murine dendritic cells. *Blood* 2002; 100: 1948-1956.
- [Yang 2002] Yang S, Linette G, Longerich S, Haluska F. Antimelanoma activity of CTL generated from peripheral blood mononuclear cells after stimulation with autologous dendritic cells pulsed with melanoma gp100 peptide G209-2M is correlated to TCR avidity. *J Immunol* 2002; 169: 531-539.

- [Zajak 1998] Zajak A, Blattmann J, Murali-Krishna K, Sourdive D, Suresh M, Altman J, Ahmed R. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med* 1998; 188: 2205-2213.
- [Zhang 1998] Zhang X, Sun S, Hwang I, Tough DF, Sprent J. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 1998; 8: 591-599.
- [Zou 2005] Zou W. Immunosuppressive networks in the tumor environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 263-274.

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
APC	Allophycocyanin
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
CD40L	CD40-Ligand
CO ₂	Kohlendioxid
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
IFN	Interferon
IL-	Interleukin
LAMP	<i>Lysosomal-associated membrane glycoproteins</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
mDC	Myeloide dendritische Zelle
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
pDC	Plasmazytoide DC

PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-A-Protein
PGE ₂	Prostaglandin-E ₂
pI:C	<i>Polyinosinic-polycytidylic acid</i>
PMA	Phorbol 12-myristat-13-acetat
PRR	<i>Pattern-recognition-Rezeptor</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Th	T-Helfer
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

Danksagung

Herrn PD Dr. med. Andreas Eigler danke ich für die Überlassung des Themas, die stetige Unterstützung sowie für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe. Für die ausführliche Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten, die kontinuierliche Betreuung und zahlreiche hilfreiche Anregungen danke ich Dr. med. Marc Dauer.

Mein besonderer Dank gilt Rosemarie Kiefl für die Einarbeitung in die Methoden, unzählige methodische Anmerkungen und ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft zu jeder Tages- und Nachtzeit.

Bei meinen Mitdoktoranden und den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, insbesondere bei Veronika Jakl, Susanne Roth, Franz Bauernfeind und Dr. med. Christian Bauer möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Herrn Prof. S. Endres danke ich für die Möglichkeit im Labor der Klinischen Pharmakologie zu arbeiten, den Mitarbeitern der Abteilung für klinische Pharmakologie danke ich für wertvolle Anregungen und ihre stetige Hilfsbereitschaft.

Veröffentlichungen

Originalarbeiten

Dauer M, Schad K, Herten J, Junkmann J, Bauer C, Kiefl R, Endres S, Eigler A.

FastDC derived from human monocytes within 48h effectively prime tumor antigen-specific cytotoxic T cells. *J Immunol Meth* 2005; 302: 145-155.

Dauer M, Schad K, Junkmann J, Bauer C, Herten J, Kiefl R, Schnurr M, Endres S, Eigler A.

IFN α promotes definitive maturation of dendritic cells generated by short-term culture of monocytes with GM-CSF and IL4. *J Leucoc Biol* 2006; 80: 278-286.

Vorträge

"Generation of monocyte-derived dendritic cells by short-term culture: Influence of Interferon-alpha on maturation, migration and priming of antigen-specific CD8 T-cells"

Doktorandenkolloquium, Medizinische Klinik Innenstadt, Klinikum der Universität München, 23.02.2007.

Lebenslauf

persönliche Daten

Jana Karina Junkmann
geboren 17.09.1981 in Unna

schulische Ausbildung

08/94 - 06/01
Gymnasium Ulricianum Aurich
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/01-06/08
Studium der Humanmedizin, LMU München
09/03
Ärztliche Vorprüfung

02/07-01/08
Praktisches Jahr
Chirurgie
Klinik München Perlach,
akademisches Lehrkrankenhaus der LMU München
Anästhesiologie
Inselspital, Universitätsspital Bern, Schweiz
Innere Medizin
Medizinische Klinik Innenstadt,
Klinikum der Universität München

06/08
Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Approbation

Dissertation

seit 08/04
Dissertation in der Arbeitsgruppe Gastroenterologische
Immuntherapie, Abteilung für Klinische Pharmakologie,
Medizinische Klinik Innenstadt,
Klinikum der Universität München

berufliche Tätigkeit

seit 10/08
Assistenzärztin, Chirurgie, Klinik München Perlach