

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Michael von Bergwelt

**Die Rolle von Kostimulation und IL-12 bei der Aktivierung von
T-Zellen und NK-Zellen durch TLR-maturierte dendritische Zellen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Bettina Otte
aus Hamburg
2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Marion Subklewe

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Christoph Salat
Prof. Dr. Torsten Haferlach

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Felix Lichtenegger

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 14.02.2019

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Was sind dendritische Zellen?	6
1.2	Reifung der dendritischen Zellen	8
1.3	Aktivierung der dendritischen Zellen durch TLR-Liganden	9
1.4	Stimulation und Polarisation der T-Zellen durch dendritische Zellen – Die 3-Signal-Hypothese	12
1.5	T-Zell-vermittelte Immunantwort	16
1.5.1	Effektorzellen der CD4 ⁺ T-Zellen	16
1.5.2	Zytotoxische T-Zellen	17
1.6	Stimulation der NK-Zellen durch dendritische Zellen	19
1.7	Rolle der dendritischen Zellen in der Immuntherapie	21
1.8	Zielsetzung	24
2	Material	25
2.1	Geräte	25
2.2	Verbrauchsmaterialien	25
2.3	Antikörper für die Durchflusszytometrie	26
2.4	Antikörper für die Blockade-Assays	27
2.5	Magnet-gekoppelte Antikörper (MicroBeads)	27
2.6	Kits	27
2.7	Zytokine, Chemokine und Toll-Like-Rezeptor-Liganden	28
2.8	Chemikalien	28
2.9	Medien	29
2.10	Puffer	29
2.11	Zellen	29
2.12	Software-Programme	29
3	Methoden	30
3.1	Dichtegradienten-Zentrifugation zur Isolierung von peripheren mononukleären Zellen	30
3.2	Zellzählung	31
3.3	Gewinnung von Monozyten mittels Plastikadhärenz	31

3.4	Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten	31
3.5	Isolierung von CD3 ⁺ T-Zellen mittels magnetischer Zellseparation	32
3.6	Autologe Kokultur von T-Zellen und dendritischen Zellen	33
3.7	Autologe Kokultur von NK-Zellen und dendritischen Zellen	33
3.8	Bestimmung der IFN- γ -Konzentration mittels ELISA	33
3.9	Durchflusszytometrie	34
3.9.1	Immunphäotypisierung von dendritischen Zellen	36
3.9.2	Intrazelluläre IFN- γ -Färbung	36
3.10	Statistische Analyse	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Differenzierung von naiven T-Zellen zu T _H 1-Zellen durch dendritische Zellen	38
4.1.1	Einfluss von IL-12 auf die T _H 1-Polarisierung	39
4.1.2	Einfluss von CD80 und CD86 auf die T _H 1-Polarisierung	41
4.1.3	Einfluss der koinhibitorischen Moleküle CD273, CD274, CD275 und CD276 auf die T _H 1-Polarisierung	44
4.1.4	Einfluss von CTLA-4 auf die T _H 1-Polarisierung	49
4.2	Aktivierung von NK-Zellen durch dendritische Zellen	52
4.2.1	Einfluss von IL-12 auf die NK-Zell-Aktivierung	53
4.2.2	Einfluss von CD80 und CD86 auf die NK-Zell-Aktivierung	55
5	Diskussion	57
5.1	Bedeutung von IL-12 bei der NK-Zell-Aktivierung und T _H 1-Polarisierung durch dendritische Zellen	57
5.2	Bedeutung von CD80 und CD86 bei der T _H 1-Polarisierung durch dendritische Zellen	59
5.3	Bedeutung von CD80 und CD86 bei der NK-Zell-Aktivierung durch dendritische Zellen	62
5.4	Bedeutung von CD274 bei der T _H 1-Polarisierung durch dendritische Zellen	62
5.5	Bedeutung von CD273 bei der T _H 1-Polarisierung durch dendritische Zellen	64
5.6	Bedeutung von CD275 bei der T _H 1-Polarisierung durch dendritische	

	Zellen	66
5.7	Bedeutung von CD276 bei der T _H 1-Polarisierung durch dendritische Zellen	67
5.8	Bedeutung von CTLA-4 bei der T _H 1-Polarisierung durch dendritische Zellen	67
6	Zusammenfassung	69
7	Literaturverzeichnis	71
8	Abkürzungsverzeichnis	83
9	Veröffentlichung	85
10	Danksagung	86

1 Einleitung

1.1 Was sind dendritische Zellen?

Erstmals beschrieben wurden dendritische Zellen (DZ) als sogenannte Langerhans-Zellen in der Epidermis im Jahr 1868. Ihre besondere immunologische Bedeutung wurde erst 100 Jahre später deutlich durch Steinman und Cohn. Isoliert wurden sie zuerst in der Milz von Mäusen, später auch in anderen lymphatischen Organen. Die Namensgebung erfolgte aufgrund der charakteristischen Morphologie mit ihren verzweigten zytoplasmatischen Ausläufern (griech. *dendron* = Baum) (Steinman & Cohn, 1973).

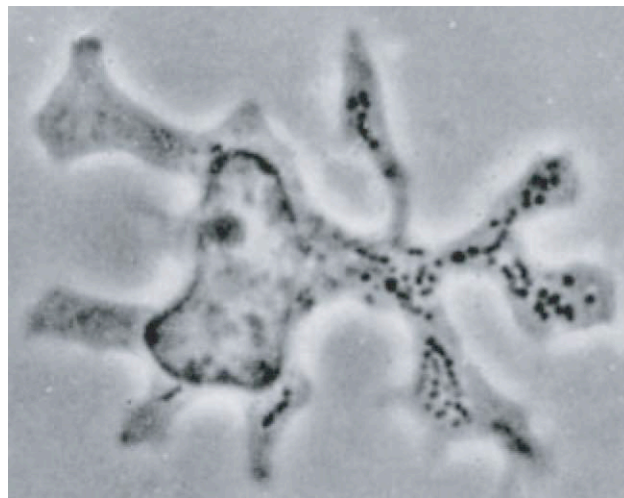


Abb. 1.1. Mikroskopische Aufnahme einer dendritischen Zelle, isoliert aus der Milz von Mäusen (Steinman & Banchereau, 2007)

Bei DZ handelt es sich um professionelle antigenpräsentierende Zellen, die aufgenommene Antigene über MHC-II-Moleküle (engl. *major histocompatibility complex*) auf ihrer Zelloberfläche präsentieren (Steinman & Banchereau, 2007). Im Gegensatz zu den B-Zellen und Makrophagen dient die Antigenpräsentation nicht ihrer eigenen Aktivierung sondern der Aktivierung naiver T-Zellen.

Mit der T-Zell-Aktivierung initiieren DZ die adaptive oder auch spezifische Immunantwort und bilden so eine wichtige Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunität (Banchereau & Steinman, 1998).

Im peripheren Blut machen DZ nur etwa 0,5 % der mononukleären Zellen (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) aus. Hauptsächlich befinden sie sich im Gewebe an allen Eintrittspforten des Körpers, zum Beispiel in der Haut als sogenannte

Langerhans-Zellen oder in den Tonsillen oder Peyer'schen Plaques, um dort eingedrungene Keime abzufangen. Einige DZ befinden sich auch in der Milz, um im Blut zirkulierende Pathogene zu entdecken.

Man unterscheidet plasmazytoide DZ und myeloide DZ. Für diese Arbeit sind vor allem die myeloiden DZ von Bedeutung. Sie differenzieren sich sowohl aus CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark als auch aus peripheren CD14⁺ Monozyten. Ihnen gegenüber stehen die plasmazytoiden DZ. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr von Virusinfektionen, indem sie nach Antigenkontakt große Mengen Typ-1-Interferone produzieren.

Durch die Fähigkeit, eine antigenspezifische Immunantwort über T-Zellen zu initiieren, sind DZ sowohl in der Tumorthherapie als auch in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen in das Blickfeld der Forscher gerückt (Jacobs et al., 2008).

Zur Forschung an DZ außerhalb des Körpers wurden verschiedene Modelle der Generierung dieser Zellen entwickelt. Insbesondere die Gewinnung von myeloiden DZ aus Monozyten aus peripherem Blut in Anwesenheit der Zytokine Interleukin-4 (IL-4) und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) hat sich als unkomplizierte und schnelle Methode erwiesen zur Generierung unreifer DZ *in vitro* (Palucka et al., 1998; Chapuis et al., 1997). Die Isolation von plasmazytoiden DZ aus peripherem Blut ist deutlich komplizierter, weshalb die meisten Studien mit myeloiden DZ durchgeführt werden. Tel et al. konnten jedoch 2013 zeigen, dass auch plasmazytoide DZ immuntherapeutisches Potenzial besitzen und eine relevante antigenspezifische T-Zell-Antwort auslösen können.

Wenn im weiteren Verlauf zur Vereinfachung von DZ gesprochen wird, sind stets myeloide DZ gemeint.

1.2 Die Reifung der dendritischen Zelle

Die Kernaufgabe der DZ ist die Auslösung einer antigen-spezifischen Immunantwort. Am Anfang dieses Prozesses steht die Antigenerkennung im peripheren Gewebe, am Ende die T-Zell-Interaktion im Lymphknoten. Dazwischen findet eine komplexe Transformation der DZ statt, die als Reifung oder auch Maturation bezeichnet wird.

Im peripheren Gewebe liegen DZ in einer unreifen Form vor. Sie werden durch makrophagenproduzierte Zytokine über Chemotaxis an das Entzündungsgeschehen gelockt (Dieu et al., 1998). Unreife DZ sind auf Makropinozytose spezialisiert, wodurch sie in der Lage sind, große Mengen an umgebender Flüssigkeit und Partikeln aufzunehmen. Aufgenommene Antigene werden anschließend an der Oberfläche über MHC-II-Moleküle präsentiert. Unreife DZ exprimieren kaum kostimulatorische Moleküle und sind nicht in der Lage, naive T-Zellen zu stimulieren (Cella et al., 1997).

Die Antigenerkennung führt zu einer Aktivierung der DZ und hat eine Reihe von Veränderungen zur Folge. Die DZ treten in das periphere lymphatische Gewebe über, wo keine Phagozytose mehr möglich ist. Außerdem wird der Chemokinrezeptor 7 (CCR7) neu exprimiert (Yanagihara et al., 1998). Dieser bindet das Molekül Chemokinligand 21 (CCL21), welches von Retikulumzellen im Lymphknoten produziert wird. Als Folge der CCR7-CCL21-Interaktion wandern die DZ Richtung Lymphknoten (Hauser & Legler, 2016). Chemokine und Wachstumsfaktoren führen dazu, dass sich in dieser Phase der Phänotyp stark verändert, man spricht von der Reifung oder auch Maturation der DZ. Ein Oberflächenmarker für reife DZ ist CD83 (engl. *cluster of differentiation*) (Zhou & Tedder, 1996). Im Zuge der Maturation werden auch die kostimulatorischen Marker CD80 und CD86 hochreguliert, auf die später noch näher eingegangen wird. Abhängig vom Immunphänotyp und der Zytokinsekretion werden verschiedene Immunreaktionen ausgelöst. Im Lymphknoten angekommen wandern die DZ in die T-Zell-Zone und können dort durch die CCL18-Produktion naive T-Zellen anziehen (Murphy et al., 2008, S. 330).

1.3 Die Aktivierung der dendritischen Zellen durch TLR-Liganden

Die Aktivierung der DZ kann auf verschiedenen Wegen geschehen. Der Aktivierungsweg bestimmt später die Art der Immunreaktion der einzelnen DZ. Während Mikroorganismen eine immunogene Reaktion auslösen, führen körpereigene Zellen zu einer Toleranz, um den Körper selbst zu schützen.

Die Antigenerkennung von Mikroorganismen erfolgt über sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (engl. *pattern recognition receptors*, PRR), die in verschiedener Ausprägung auf allen Zellen des angeborenen Immunsystems auf ihrer Oberfläche zu finden sind (Jin, Sun, Yu, Yang & Yeo, 2012). Mustererkennungsrezeptoren erkennen bestimmte pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. *pathogen associated molecular patterns*, PAMP). PAMP sind Proteine, die für die Mikroorganismen überlebenswichtige Funktionen übernehmen und daher über die Evolution hinweg konserviert wurden. Typische PAMP sind beispielsweise die Lipopolysaccharide (LPS) in der Zellwand von Bakterien, doppelsträngige Ribonukleinsäure (RNA) oder Mannose.

Es hat sich gezeigt, dass DZ, die über bestimmte Mustererkennungsrezeptoren *in vitro* aktiviert wurden, deutlich potenter bei der T-Zell-Aktivierung im Vergleich zu konventionell hergestellten DZ sind und dadurch besser geeignet für immuntherapeutische Ansätze. Die Entdeckung von Liganden für diese Mustererkennungsrezeptoren als Adjuvantien in der *in vitro*-Generierung von DZ hat daher besondere Bedeutung erlangt.

Aktuell sind fünf verschiedene Klassen von Mustererkennungsrezeptoren bekannt. Man unterscheidet Toll-like-Rezeptoren (TLR), NOD-like-Rezeptoren (engl. *nucleotide binding oligomerization domain-like receptors*, NLR), C-Typ-Lektin-Rezeptoren (CLR), RIG-I-like-Rezeptoren (engl. *retinoid induced gene-1-like receptors*, RLR) und zytosolische DNA-Rezeptoren (CDR) (Jin et al., 2012). Die TLR sind membrangebunden und befinden sich entweder auf der Zelloberfläche oder in intrazellulären Vesikeln. Alle anderen Mustererkennungsrezeptoren befinden sich im Zytosol.

Für diese Arbeit sind vor allem die TLR von Interesse. Sie sind auch die bisher am besten untersuchten Mustererkennungsrezeptoren (Rock et al., 1998). Sie befinden sich auf

Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen, wobei DZ die größte Bandbreite an TLR auf ihrer Oberfläche aufweisen (Napolitani et al., 2005).

Auch wenn alle TLR unterschiedliche pathogenassoziierte Muster erkennen, ähneln sie sich in ihrem strukturellen Aufbau. Man unterscheidet eine extrazelluläre und eine intrazelluläre Domäne (Suresh & Mosser, 2013). Erstere besteht aus leucinreichen Wiederholungen (engl. *leucine rich repeats*, LRR) und ist für die Bindung des Liganden und damit die PAMP-Erkennung verantwortlich. Die intrazelluläre Domäne ähnelt dem Interleukin-1-Rezeptor und wird daher Toll-/IL-1-Rezeptor-(TIR)-Domäne genannt. Sie vermittelt die Signaltransduktion in die Zelle (Takeda & Akira, 2005).

Bisher sind elf verschiedene TLR bekannt, wobei im Menschen nur zehn davon funktionell aktiv sind (Takeda & Akira, 2005). TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5 und TLR-6 befinden sich auf der Zelloberfläche und erkennen hauptsächlich bakterielle Bestandteile. TLR-3, TLR-7, TLR-8 und TLR-9 befinden sich intrazellulär und erkennen vor allem Nukleinsäuren (Suresh & Mosser, 2013). Die Funktion von TLR-10 bleibt bisher unbekannt. Die TLR können sowohl allein als auch als Homo- oder Heterodimere ihre Funktion ausüben.

TLR-Rezeptoren	Liganden
TLR-1/-2-Heterodimer	Peptidoglykan, Lipoproteine, Zymosan
TLR-2/-6-Heterodimer	Tripalmitol-S-Glycerilcysteinyl (Pam ₃ Cys)
TLR-3	Doppelstrang-RNA Polyinosin-polycytidylsäure (poly(I:C))
TLR-4	Lipopolysaccharide
TLR-5	Bakterielles Flagellin
TLR-7	Einzelstrang-RNA
TLR-8	Imidazoquinolin-Derivate (z.B. Resiquimod)
TLR-9	Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid-DNA (CpG-DNA)

Tab. 1.1 Die wichtigsten TLR und ihre Liganden (Takeda & Akira, 2005)

Eine Interaktion der TLR mit ihren Liganden führt über eine komplexe Signalkaskade zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Nekrosefaktor- κ B (NF- κ B) und IRF (engl. *interferon regulatory factors*) und mündet schließlich in der Sekretion von antimikrobiellen Faktoren wie Interferonen, Tumornekrosefaktoren und Interleukinen (Mäkela et al., 2009).

In den letzten Jahren wurden synthetische TLR-Agonisten hergestellt. Beispiele sind Resiquimod (R848), ein TLR-7-Agonist, und poly-(I:C), ein TLR-3-Agonist (Bhardwaj, Gnjatic & Sawhney, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von DZ durch Hinzugabe dieser beiden TLR-Agonisten in eine *in vitro*-Kultur mit DZ zu einem starken Anstieg der IL-12-Produktion durch eben diese DZ führte (Mäkela et al., 2009). IL-12 wird von aktivierten DZ produziert und ist als Zytokin verantwortlich für die Differenzierung von naiven T-Zellen zu T-Helfer-Zellen Typ 1 (T_H1-Zellen). Somit kann die Höhe der IL-12-Produktion als Maß für die Aktivierung der DZ gesehen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Hinzunahme von TLR-Agonisten zum Maturierungscocktail von DZ deutlich überlegenere DZ hervorbringt im Hinblick auf die IL-12-Produktion als der gewöhnliche Maturierungscocktail (Beck et al., 2011).

1.4 Die Stimulation und Polarisation der T-Lymphozyten durch dendritische Zellen – Die 3-Signal-Hypothese

T-Zellen sind wichtige Akteure in der zellvermittelten, adaptiven Immunantwort. Sie reifen im Thymus und zirkulieren als naive T-Lymphozyten im Blut und in den peripheren Lymphgefäßen. Im Lymphknoten treffen sie auf reife DZ, die ihnen das Antigen präsentieren, gegen welches sich die Immunantwort richten soll. Anschließend differenziert sich die naive T-Zelle in verschiedene Effektorzellen.

Bei der Aktivierung der T-Zellen unterscheidet man drei Signale, die von den DZ gesendet werden. Alle zusammen werden benötigt, um eine Proliferation und Differenzierung der T-Zelle zu initiieren (Murphy et al., 2008, S. 344).

Signal 1 beschreibt die Aktivierung der T-Zelle über den T-Zell-Rezeptor durch Bindung an das antigenbeladene MHC-Molekül auf der DZ. Dieses Signal ist maßgeblich für die Antigen-spezifität verantwortlich. Dies allein reicht jedoch für eine effektive T-Zell-Aktivierung nicht aus, sondern weitere Signale werden benötigt. Fehlen weitere Signale, kommt es zu einem Stadium der T-Zell-Anergie gegen das präsentierte Antigen. Dies verhindert, dass T-Zellen sich gegen körpereigene Antigene richten (Bour-Jordan & Bluestone, 2002).

Signal 2 wird durch verschiedene Korezeptoren auf der Oberfläche der DZ vermittelt, die an entsprechende Rezeptoren auf der Oberfläche der T-Zellen binden. Die Rezeptoren können sowohl stimulatorische als auch inhibitorische Signale vermitteln. Die am besten untersuchten Korezeptoren auf der Oberfläche der DZ sind die der B7-Familie. Hierbei handelt es sich um Glykoproteine aus der Immunglobulin-Superfamilie. Insbesondere die beiden Moleküle CD80 und CD86 liefern ein wichtiges kostimulatorisches Signal zur Aktivierung der T-Zellen (Collins et al., 2005). Wie bereits beschrieben, werden sie während des Reifungsprozesses der DZ hochreguliert und auf der Oberfläche der DZ exprimiert. Über die Bindung an CD28 auf der T-Zelle, ebenfalls ein Rezeptor aus der Immunglobulin-Superfamilie, liefern sie das entscheidende Signal zur Proliferation der T-Zelle. Die CD80/CD86-Interaktion mit CD28 bewirkt eine vermehrte IL-2-Ausschüttung, zum einen durch Stabilisierung der für IL-2 kodierenden Messenger-RNA (mRNA) (Lindstein et al., 1989), zum anderen durch Steigerung der Expression des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Verweij, Geerts & Aarden, 1991).

Um eine überschießende Immunreaktion zu vermeiden, kommt es nach der Bindung zwischen CD80/CD86 und CD28 zur Hochregulierung eines weiteren Rezeptors auf der T-Zelle, dem CTLA-4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*). Dieser ähnelt strukturell dem Rezeptor CD28, funktionell antagonisiert er jedoch die Wirkung von CD28 (Bour-Jordan & Bluestone, 2002). Er bindet ebenso die beiden Moleküle CD80 und CD86, jedoch mit einer etwa 20-fach höheren Affinität (Murphy et al., 2008, S. 346). Der Signalweg über CTLA-4 bildet also einen wichtigen inhibitorischen Faktor in der Regulation der Immunantwort.

Es befinden sich noch eine Vielzahl weiterer kostimulatorischer und koinhibitorischer Rezeptoren auf der Oberfläche der DZ, die zum Teil besser, zum Teil auch weniger gut in ihrer Funktion untersucht sind. Wichtige Mitglieder der B7-Familie neben CD80 und CD86 sind die beiden Korezeptoren CD273 und CD274. Sie binden an den Rezeptor PD-1 (engl. *programmed cell death protein 1*) auf der T-Zelle und senden inhibitorische Signale an die T-Zelle. Deutlich wird dies bei PD-1-defizienten Mäusen, bei denen vermehrt das Auftreten von Autoimmunerkrankungen beobachtet wurde (Carter et al., 2002). In der Klinik weit häufiger verbreitet sind die Namen PD-L1 (engl. *programmed death-ligand 1*) für CD274 und PD-L2 (engl. *programmed death-ligand 2*) für CD273. Im Folgenden werden jedoch im Sinne der Einheitlichkeit nur die Namen der CD-Nomenklatur verwendet.

CD275 ist ein weiterer Korezeptor und bindet an den Rezeptor ICOS (engl. *inducible costimulator*) auf der T-Zelle. In der Literatur werden sowohl stimulatorische als auch inhibitorische Wirkungen beschrieben (Sharpe, 2009).

Für den Korezeptor CD276 konnte bisher noch kein entsprechender Ligand auf der T-Zelle identifiziert werden. Auch die Datenlage zu seiner Wirkung, inhibitorisch oder stimulatorisch, geht weit auseinander (Leung & Suhl, 2014).

B7-Molekül	Ligand	Wirkung	Quelle
CD80 (B7-1) CD86 (B7-2)	CD28 CTLA-4 (CD152)	stimulatorisch inhibitorisch	Bour-Jordan & Bluestone, 2002
CD273 (B7-DZ/ PD-L2) CD274 (B7-H1/PD-L1)	CD279 (PD-1)	inhibitorisch inhibitorisch	Carter et al., 2002
CD275 (B7-H2/ ICOS-L)	CD278 (ICOS)	stimulatorisch und inhibitorisch	Sharpe, 2009
CD276 (B7-H3)	unbekannt	umstritten	Leung & Suhl, 2014

Tab. 1.2. Die in dieser Arbeit untersuchten Korezeptoren der B7-Familie und ihre Liganden auf der T-Zelle

Neben den hier untersuchten Rezeptoren der B7-Familie existieren noch weitere Mitglieder, wie zum Beispiel B7-H4 (Sica et al., 2003) oder B7-H6 (Brandt et al., 2009), auf die hier nicht näher eingegangen wird.

Das Signal 3 bezeichnet die von den DZ sezernierten Zytokine. Diese haben Einfluss darauf, zu welcher Effektorzelle sich die T-Zelle differenziert (Kalinski et al., 1999). Für CD4⁺ T-Zellen gibt es folgende mögliche Differenzierungswege: T-Helfer-Zellen Typ 1 (T_H1-Zellen), Typ 2 (T_H2-Zellen), regulatorische T-Zellen (T_{reg}-Zellen) oder T_H17-Zellen.

Die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu T_H1-Zellen wird maßgeblich durch das Zytokin IL-12 reguliert. IL-12 ist ein heterodimeres Protein (IL-12p70) bestehend aus zwei über Disulfid-Brücken miteinander verbundenen Untereinheiten, p35 und p40 (Gately et al., 1998). Es wird von DZ sezerniert, wenn diese Kontakt zu Pathogenen hatten. Zwei weitere mit IL-12 verwandte Zytokine sind IL-23 und IL-27, die ebenfalls eine T_H1-gerichtete Immunantwort auslösen (Trinchieri, 2003).

Hauptverantwortlich für die Differenzierung von naiven T-Zellen zu T_H2-Zellen ist das Zytokin IL-4. Insgesamt ist die T_H2-Polarisierung jedoch noch nicht in dem Maße verstanden wie die T_H1-Polarisierung. Neben IL-4 spielen mit großer Wahrscheinlichkeit auch andere Faktoren eine Rolle, da in einigen Experimenten eine T_H2-Zell-Differenzierung auch in Abwesenheit von IL-4 erreicht werden konnte (Zhu, 2015).

Sind die DZ weder differenziert noch maturiert, sezernieren sie IL-10 und TGF- β und bewirken damit eine Ausdifferenzierung der naiven T-Zellen zu T_{reg}-Zellen (Murphy et al., 2008, S. 355).

Die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu T_H17-Zellen ist noch nicht eindeutig geklärt. Die Anwesenheit der Zytokine IL-6 und TGF- β sollen eine Rolle spielen, neuere Erkenntnisse lassen jedoch IL-23 als maßgeblichen Faktor vermuten (Hirahara & Nakayama, 2016).

1.5 Die T-Zell-vermittelte Immunantwort

Wie bereits dargestellt, sind T-Zellen die entscheidenden Akteure der adaptiven Immunantwort. Anhand der verschiedenen Oberflächenmarker unterscheidet man zwei verschiedene Typen von T-Zellen: CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen. Die beiden T-Zell-Gruppen differenzieren sich nach der Aktivierung durch DZ in unterschiedliche Effektorzellen. Im Gegensatz zu naiven T-Zellen müssen Effektorzellen nicht mehr aktiviert werden, um ihre Funktion zu erfüllen.

1.5.1 Die Effektorzellen der CD4⁺ T-Zellen

Nach Interaktion mit DZ können naive CD4⁺ T-Zellen sich in Abhängigkeit des erhaltenen Signals zu vier verschiedenen Effektorzellen differenzieren: T-Helfer-Zellen Typ 1 (T_H1-Zellen), T-Helfer-Zellen Typ 2 (T_H2)-Zellen, T_H17-Zellen und adaptive regulatorische T-Zellen (T_{reg}-Zellen). Die Funktionen dieser Effektorzellen sind bedingt durch die verschiedenen Zytokine, die sie produzieren (Murphy et al., 2008, S. 350).

T_H1-Zellen sind durch die Produktion von IL-2, Interferon- γ (IFN- γ) und Lymphotoxin charakterisiert (Mosmann & Coffman, 1989). IFN- γ ist hauptverantwortlich für die Funktion der T_H1-Zellen. Es besitzt sowohl antiinflammatorische als auch antitumorale Wirkungen. Erstere wird zum einen über die Aktivierung von Makrophagen vermittelt, die über Phagozytose Mikroorganismen eliminieren, zum anderen über eine Stimulation der B-Zell-Antwort, die durch Sezernierung von Immunglobulinen zur Opsonierung und ebenfalls Eliminierung des Keims beitragen (Abbas et al., 1996). Die antitumorale Wirkung von IFN- γ wird über eine Verstärkung der zytotoxischen Wirkung von NK-Zellen vermittelt sowie über eine Hochregulation von MHC-Molekülen auf Zielzellen, die dadurch empfänglicher für eine T-Zell-vermittelte Immunantwort werden (Schroder et al., 2004).

T_H2-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr extrazellulärer Parasiten. Wie bereits dargestellt, ist IL-4 ein wichtiger Faktor bei ihrer Differenzierung aus naiven T-Zellen. Sie aktivieren die humorale Immunantwort. Über die Produktion von IL-4, IL-13 und IL-5 führen sie zu einem Klassenwechsel der von B-Zellen produzierten Antikörper von IgM zu IgG und IgE. Darüberhinaus können sie Makrophagen und eosinophile Granulozyten anlocken und aktivieren. T_H2-Zellen tragen außerdem zur Entwicklung von Allergien bei (Zhu, 2015; Abbas et al., 1996).

Naive CD4⁺ T-Zellen können sich in Anwesenheit von IL-10 und TGF- β auch zu T_{reg}-Zellen differenzieren. T_{reg}-Zellen besitzen eine immunsuppressive Funktion, vor allem über die Produktion von IL-10 und TGF- β . Beide Zytokine hemmen die T-Zell-Proliferation, IL-10 kann zusätzlich noch die IL-12-Produktion der DZ hemmen und somit ihre Funktion, naive T-Zellen zu aktivieren, aufheben. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Prävention von Autoimmunerkrankungen und limitieren eine Immunantwort. Als Oberflächenmarker exprimieren sie neben CD4 noch CD25 und FoxP3 (engl. *forkhead box protein P3*) (Chen, 2011). Neben den aus CD4⁺ T-Zellen entstehenden T_{reg}-Zellen gibt es auch noch sogenannte natürliche T_{reg}-Zellen, die direkt im Thymus entstehen. Sie sind in ihrer Funktionsweise vergleichbar mit den hier beschriebenen T_{reg}-Zellen (Sakaguchi et al., 2006).

Über die Funktion der T_H17-Zellen ist bisher wenig bekannt, ihre Namensgebung erfolgte aufgrund ihrer Produktion von IL-17, welches an der Pathogenese einiger Autoimmunerkrankungen beteiligt zu sein scheint (Hirahara & Nakayama, 2016).

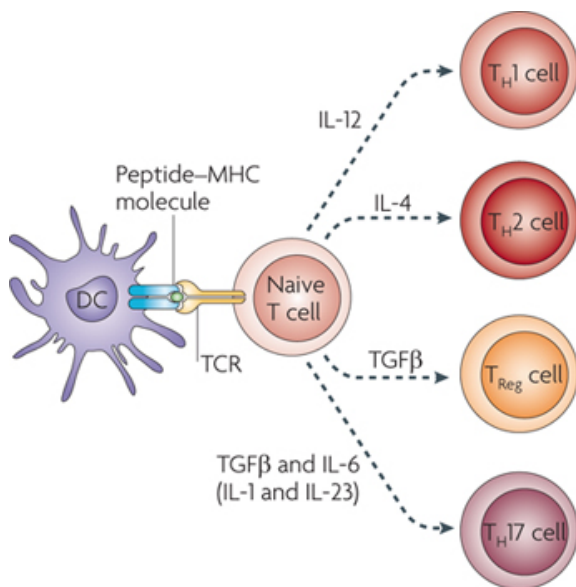


Abb. 1.2 Die Effektorzellen der CD4⁺ T-Zelle (adaptiert von Zou & Restifo, 2010)

1.5.2 Zytotoxische T-Zellen

Bei zytotoxischen T-Zellen handelt es sich um ausdifferenzierte CD8⁺ T-Zellen, welche die außergewöhnliche Fähigkeit besitzen, andere Zellen zu lysieren. Sie benötigen dafür eine Antigenpräsentation über MHC-I-Moleküle, die es ihnen ermöglicht, Tumorzellen

oder virusinfizierte Zellen zu erkennen und gegenüber körpereigenen, gesunden Zellen abzugrenzen. Es gibt zwei Mechanismen, die zu einer Abtötung der Zielzelle führen können. Zum einen enthalten zytotoxische T-Zellen zytoplasmatische Granula mit Perforinen und Granzym B, die nach Aktivierung via Exozytose freigesetzt werden. Perforin bildet in der Zielzelle eine Pore, wodurch Granzym B, eine Serinprotease, ins Zytoplasma der Zielzelle eintreten und dort die Apoptose einleiten kann (Hishii et al., 1999). Zum anderen können aktivierte zytotoxische T-Zellen Fas-Ligand auf der Oberfläche exprimieren. Durch Bindung an Fas (CD95), welches sich auf fast allen Zellen befindet, kann Apoptose induziert werden (Schütt & Bröker, 2011, S. 56).

Neben den lytischen Funktionen produzieren aktivierte zytotoxische T-Zellen zusätzlich Zytokine wie IFN- γ oder TNF- α , die ihre zytotoxische Wirkung noch verstärken. IFN- γ bewirkt beispielsweise eine Hochregulation von MHC-I-Molekülen auf den Zielzellen, wohingegen TNF- α eine direkte apoptotische Wirkung besitzt.

Für die Differenzierung von naiven CD8⁺ T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen wird die Interaktion mit DZ benötigt. Ähnlich wie bei der Aktivierung von CD4⁺ naiven T-Zellen sind – neben der T-Zell-Rezeptor-Bindung an den MHC-II-Peptid-Komplex der DZ – kostimulatorische Signale wie zum Beispiel eine CD70-CD27-Interaktion sowie die Ausschüttung einiger Zytokine, vor allem IL-12, notwendig (Palucka & Banchereau, 2013). Man konnte jedoch zeigen, dass DZ für diese Aktivierung allein nicht ausreichen, sondern die Hilfe von T_H1-Zellen benötigen (Hoyer et al., 2014). Über eine Interaktion zwischen CD40L-CD40 kommt es zu einer verstärkten Expression kostimulatorischer Moleküle auf der DZ und damit Verstärkung des aktivierenden Signals für zytotoxische T-Zellen (Pardoll & Topalian, 1998). Außerdem entwickeln sich nur in der Anwesenheit von T_H1-Zellen effektive CD8⁺ Gedächtniszellen (Sun & Bevan, 2003).

Durch ihre Fähigkeit, virusinfizierte Zellen und Tumorzellen zu erkennen und abtöten zu können, kommt den zytotoxischen T-Zellen eine besondere Bedeutung in der Forschung zu. Ziel einer effektiven Immuntherapie ist die möglichst antigenspezifische Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen. Die Erkenntnis, dass T_H1-Zellen essenziell für eine starke antitumorale Immunantwort durch zytotoxische T-Zellen sind, hat dazu geführt, dass ein vermehrtes Augenmerk auf die Kapazität dendritischer Zellen, eine optimale T_H1-Polarisierung herbeizuführen, gelegt wurde.

1.6 Stimulation der NK-Zellen durch dendritische Zellen

Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen, engl. *natural killer cells*) wurden erstmals in den 1970er Jahren als eigene Zellgruppe definiert (Herberman & Ortaldo, 1981). Sie sind Teil des angeborenen Immunsystems und stammen von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark ab. Sie besitzen die Fähigkeit, Tumorzellen sowie virusinfizierte Zellen zu erkennen und abzutöten. Hierzu bedürfen sie – im Gegensatz zu den zytotoxischen T-Zellen – keiner vorherigen antigenspezifischen Aktivierung. Sie sind vor allem in der frühen Phase der Immunantwort aktiv, wenn die antigenspezifische, adaptive Immunantwort erst aktiviert werden muss.

Es konnte gezeigt werden, dass ein Mangel oder eine Funktionsuntüchtigkeit von NK-Zellen mit verschiedenen malignen Erkrankungen assoziiert ist (Lion et al., 2012).

Morphologisch handelt es sich bei NK-Zellen um relativ große Lymphozyten mit multiplen intrazellulären zytotoxischen Granula. Sie machen ca. 10-15 % aller Leukozyten im peripheren Blut aus. Der Phänotyp der NK-Zellen ist durch eine hohe Expression des Markers CD56 charakterisiert (Lion et al., 2012). Außerdem besitzen NK-Zellen auf ihrer Oberfläche viele weitere sowohl aktivierende als auch inhibitorische Rezeptoren, die in engem Zusammenspiel die Funktion der Zellen bestimmen.

Diese Rezeptoren gehören zwei großen Superfamilien an. Zum einen können sie strukturell den Lektinen ähneln, sogenannte KLRs (engl. *killer lectin-like receptors*), zum anderen können Sie der Immunglobulin-Superfamilie angehören, den sogenannten KIRs (engl. *killer cell immunoglobulin-like receptors*) (Schütt & Bröker, 2011, S. 27). Angehörige beider Gruppen können sowohl aktivierende als auch hemmende Eigenschaften besitzen (Murphy et al., 2008, S. 97).

Die inhibitorischen Rezeptoren binden MHC-I-Moleküle, die auf allen Körperzellen exprimiert werden. Eine Bindung zwischen MHC-I-Molekülen und den inhibitorischen Rezeptoren sendet negative Signale in die Zelle und verhindert dadurch eine Hochregulation der aktivierenden Rezeptoren. Eine hohe MHC-I-Expression auf der Oberfläche schützt gesunde Zellen somit vor Elimination durch NK-Zellen (Mentlik et al., 2013). Über MHC-I-Moleküle werden zelleigene Peptide präsentiert, was im Falle von Infektionen oder Tumoren, zytotoxische T-Zellen aktiviert.

Einige Tumorzellen versuchen jedoch diesen zytotoxischen T-Zellen zu entgehen, indem sie die Expression von MHC-I-Molekülen herunterregulieren. Dies führt dann jedoch zu einem Überwiegen der aktivierenden Rezeptoren auf den NK-Zellen. Es kommt zur Ausschüttung von großen Mengen IFN- γ sowie zur Freisetzung der zytotoxischen Granula. Man hat außerdem beobachtet, dass isolierte NK-Zellen *in vivo* noch weitere stimulierende Signale benötigen, um große Mengen an IFN- γ zu produzieren. Diese Signale können zum Beispiel durch die Zytokine IFN- α und IFN- β geliefert werden. Aber auch bestimmte Proteine, produziert durch virusinfizierte Zellen, oder IL-2, welches beispielsweise von T_H2-Zellen sezerniert wird, können ausreichend für eine Aktivierung sein (Kalinski et al., 2005).

Ist die NK-Zelle aktiviert, kommt es zur Expression des Oberflächenmarkers CD69, welcher daher vielfach in der Forschung als Erkennungszeichen aktivierter NK-Zellen verwendet wird. Der Lysemechanismus der NK-Zellen ähnelt schließlich dem der zytotoxischen T-Zellen, da die Granula ebenfalls Perforin, Granzym B sowie Granlysin enthalten, welches intrazelluläre Erreger abtöten kann.

Durch ihre Fähigkeit, Tumorzellen zu beseitigen und große Mengen IFN- γ zu produzieren, sind NK-Zellen – ähnlich wie zytotoxische T-Zellen – von besonderem Interesse in der Immuntherapie. Einige Arten von Immuntherapie zielen darauf ab, eine möglichst starke NK-Zell-Aktivierung herbeizuführen. Fernandez et al. konnten bereits 1999 zeigen, dass unter anderem auch DZ direkt mit NK-Zellen interagieren können und zu einer Aktivierung derselben führen mit Verstärkung der zytotoxischen Aktivität und der IFN- γ -Produktion (Fernandez et al., 1999). Die genauen Mechanismen der NK-Zell-Aktivierung durch DZ sind jedoch noch nicht abschließend geklärt. Neben der IL-12-Sekretion scheint auch ein direkter Zellkontakt notwendig zu sein (Gerosa et al., 2005).

1.7 Die Rolle der dendritischen Zellen in der Immuntherapie

Immuntherapie ist ein Oberbegriff für verschiedene Methoden, in das Immunsystem einzugreifen: stimulierend, supprimierend, modulierend oder substituierend. Typische Indikationen für supprimierende Immuntherapie sind Autoimmunerkrankungen, Transplantatabstoßungen oder Anaphylaxie. Die Hyposensibilisierung bei Allergien bezeichnet man als modulierende oder auch spezifische Immuntherapie. Eine klassische substituierende Maßnahme ist die passive Immunisierung mit Antikörpern als Postexpositionsprophylaxe beispielsweise bei einem Verdacht auf eine Tetanus- oder Tollwutinfektion. Monoklonale Antikörper finden außerdem Anwendung bei Autoimmunerkrankungen. Eine besonders und zunehmend wichtige Anwendung der Immuntherapie ist die Behandlung von malignen Erkrankungen.

Schon lange ist bekannt, dass das Immunsystem die Fähigkeit besitzt, auch Tumorzellen zu eliminieren. Erstmals beobachtete dies William B. Coley, der bei Sarkom-Patienten ein klinisches Ansprechen sah, nachdem er bakterielle Toxine in den Tumor injizierte (Coley, 1893). Inzwischen ist bekannt, dass die Tumormunität maßgeblich durch zytotoxische T-Zellen vermittelt wird. Für eine Immuntherapie ist es daher erstrebenswert, eine möglichst starke CD8⁺ T-Zell-vermittelte, tumorspezifische Immunantwort zu generieren (Wimmer et al., 2014). Diese Erkenntnis versuchte man zu nutzen und transferierte CD8⁺ T-Zellen in Patienten mit malignem Melanom. Tatsächlich kam es zu einer antigenspezifischen Immunantwort und zu einem klinischen Therapieansprechen (stabile Erkrankung bei 5 von 10 Patienten, sowie „minor“ oder „mixed response“ in 3 weiteren Patienten über einen Zeitraum von mindestens 21 Monaten, die vorher eine progressive Erkrankungen hatten) (Yee et al., 2002). Die T-Zell-Therapie wurde seither weiterentwickelt mit vielversprechenden Ansätzen. Ein Beispiel ist die CAR-T-Zell-Therapie (CAR= chimärer Antigenrezeptor). Die Besonderheit dieser T-Zellen ist die Möglichkeit der Antigenerkennung auch ohne MHC-Moleküle. Anwendung findet diese Art der Immuntherapie zurzeit in der Therapie von Lymphomen (Ramos et al., 2016).

Neben dem direkten Zelltransfer in den Menschen gibt es auch die Möglichkeit, die körpereigene Immunantwort durch die Gabe von blockierenden oder stimulierenden Antikörpern, sogenannten Checkpoint-Inhibitoren, zu beeinflussen. Die Antikörper sollen *in vivo* an Rezeptoren auf der Oberfläche der T-Zellen binden und sie so entweder

aktivieren oder hemmen. Beispiele dafür sind der blockierende Antikörper gegen CTLA-4, Ipilimumab, oder die PD-1-Blockade mit Nivolumab. Ein Nachteil dieser Methodik ist die sehr unselektive Stimulation des Immunsystems und Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen, woraus schwerwiegende Nebenwirkungen resultieren können (Wimmers et al., 2014).

Auf der Suche nach spezifischen T-Zell-Aktivatoren sind DZ in den Fokus der Forschung gerückt. Durch ihre zentrale Rolle als Auslöser einer Immunantwort sind DZ ideale Vehikel für eine antigenspezifische stimulierende Immuntherapie. Ziel ist es also, die Patienten mit DZ zu impfen, um dann eine entsprechende Tumorbekämpfung auszulösen (DZ-Vakzine).

Drei wichtige Schritte sind notwendig für eine erfolgreiche Immuntherapie mit DZ. Erstens müssen DZ *ex vivo* generiert werden. Anfänglich wurden DZ anhand morphologischer Kriterien direkt aus peripherem Blut isoliert und angereichert (Freudenthal & Steinman, 1990). Später hat sich jedoch vor allem die Generierung aus CD14⁺ Monozyten bzw. aus CD34⁺ Stammzellen unter der Hinzugabe der Zytokine IL-4 und GM-CSF etabliert.

Zweitens muss man die DZ mit dem gewünschten Antigen beladen, gegen das sich die Immunantwort richten soll. Die Beladung von DZ mit Antigenen kann sowohl *ex vivo* als auch *in vivo* stattfinden, wobei *ex vivo* die gängigste Methode ist (Palucka & Banchereau, 2013). Dabei gibt es mehrere Möglichkeiten, die Tumorantigene der DZ zuzuführen, wie zum Beispiel über einzelne tumorspezifische Peptide, über Kokultur mit ganzen Tumorzellen oder über für Tumorantigene kodierende mRNA.

Die einzelnen Methoden werden im Folgenden kurz erläutert. Zunächst wurde die Antigenbeladung überwiegend durch tumorspezifische Peptide vorgenommen. Einige Studien konnten zeigen, dass peptidbeladene DZ-Vakzine sowohl bei Gesunden als auch in Tumorpatienten peptidspezifische CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen induzieren können (Berger & Schultz, 2003; Schuler-Thurner et al., 2002). Diese Methode hat jedoch einige Nachteile. Da einige Peptide nur an bestimmte HLA-Typen binden, musste vorher eine HLA-Typisierung des Patienten erfolgen. Außerdem konnten durch Peptide nur eine geringe Anzahl an Tumorantigenen der DZ zugeführt werden, wohingegen Tumorzellen eine Vielzahl von Antigenen exprimieren. Um dies zu umgehen, versuchte man, DZ mit

Tumorlysaten zu programmieren, damit das gesamte Spektrum von Tumorantigenen abgebildet wird. Nachteil hier ist die erschwerte Gewinnung von Tumormaterial und die mögliche Sensibilisierung gegen körpereigene Antigene und die damit verbundene Autoreaktivität der T-Zellen. Eine neue Methode ist die Transfektion mit mRNA, zum Beispiel durch Elektroporation der DZ (Van Tendeloo et al., 2001). Über elektrische Impulse wird die Zellmembran der DZ kurzzeitig permeabel gemacht, sodass die mRNA in die Zellen eingeschleust werden kann. Verschiedene präklinische Studien konnten eine gute tumorgerichtete Immunantwort durch RNA-transfizierte DZ demonstrieren (Berger & Schultz, 2003).

Dritte und letzte Voraussetzung für eine adäquate Immuntherapie mit DZ ist eine starke Aktivierung der DZ, sodass sie eine möglichst effektive zytotoxische Immunantwort auslösen. 2001 konnten Jonuleit et al. in einer Studie zeigen, dass reife DZ unreifen DZ deutlich überlegen sind in der Induktion einer antigenspezifischen zytotoxischen Immunreaktion. Dies hatte zur Folge, dass viele verschiedene Zusammensetzungen von Zytokinen getestet wurden, um eine optimale Reifung von DZ herbeizuführen. Die in den meisten Studien verwendeten dendritischen Zellen wurden aus einer Kombination mit den Zytokinen IL-6, PGE₂, TNF- α und IL-1 β maturiert (Jonuleit et al., 1997). Diese DZ besitzen zwar eine starke Expression kostimulatorischer Marker, jedoch war ihre IL-12-Produktion, die entscheidend für eine T_H1-Polarisierung ist, nur gering. Dies könnte die bislang nur eingeschränkten klinischen Ansprechraten der DZ-Vakzine erklären. Durch die Entdeckung der Toll-like-Rezeptoren hat sich eine weitere Möglichkeit ergeben, DZ in Richtung einer T_H1-Antwort zu polarisieren. Viele Kombinationen sind untersucht worden, wobei die Kombination von R848, einem TLR-7/8-Agonisten, mit poly-(I:C), einem TLR-3-Agonisten, sich als gutes Adjuvanz herausgestellt hat, um DZ mit starker IL-12-Produktion zu generieren (Spranger et al., 2010).

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Der Erfolg einer Immuntherapie mit DZ hängt von einer starken antigenspezifischen Immunantwort gegen entsprechende Tumorzellen ab. Ziel dieser Arbeit war die Nachstellung sowohl der T-Zell-Aktivierung durch DZ als auch der NK-Zell-Aktivierung durch DZ *in vitro* und anschließende Modulation dieser Interaktion durch verschiedene blockierende Antikörper. Diese Untersuchungen sollen perspektivisch dazu beitragen, die zugrunde liegenden Mechanismen besser zu verstehen, sowie neue immuntherapeutische Optionen zu finden, um die therapeutischen Erfolge der DZ-Vakzine zu verbessern. Das verwendete *in vitro*-Modell ist bereits in vorherigen Experimenten etabliert worden (Lichtenegger et al., 2012).

In dieser Arbeit wurden die Experimente mit TLR-matürten DZ durchgeführt. Diese DZ entsprechen der neuen Generation von DZ-Vakzinen und haben sich als deutlich potenter im Gegensatz zu vorher verwendeten DZ erwiesen (Beck et al., 2011). Zum Vergleich wurden alle Versuche auch mit den konventionellen DZ (Jonuleit et al., 1997) durchgeführt, um die Überlegenheit der neueren DZ nochmals zu bestätigen. Als dritte Vergleichsgruppe wurden tolerogene DZ ausgewählt, die mit IL-10 maturiert wurden.

Wie bereits herausgearbeitet wurde, sind die wichtigen Einflussfaktoren bei der T_H1 -Polarisierung durch DZ das Zytokin IL-12, sowie die kostimulatorischen Rezeptoren CD80 und CD86 und der koinhibitorische Rezeptor CTLA-4. Daher wurden zur Modulation der DZ-T-Zell-Interaktion blockierende Antikörper gegen eben diese Signale untersucht. Zusätzlich wurde die Wirkung von 4 weiteren Rezeptoren der B7-Familie untersucht: CD273, CD274, CD275, CD276.

2 Material

2.1 Geräte

Produkt	Hersteller
FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Multifuge 3SR	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Eppendorf Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Lamina Flow Werkbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnebühl-Genkingen, Deutschland
Lichtmikroskop Telaval 31	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Inkubator	Binder, Tuttlingen, Deutschland
MACS-Säulen (MS-Columns) und Magnetständer	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
ELISA Microplate Reader	MTX Lab Systems, Bradenton, Florida, USA
ELISA Microplate Washer	MTX Lab Systems, Bradenton, Florida, USA
Neubauer-Zählkammer	Brand GmbH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Kühl- und Gefrierschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Wasserbad	Julabo, Seelbach, Deutschland
Manuelle Pipetten (Einkanal- und Mehrkanalpipetten)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetboy	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz

2.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Serologische Pipetten (5, 10, 25, 50 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einweg-Pasteurpipetten	VWR International, Radnor,

Pipettenspitzen (10, 100, 200, 1000 µl)	Pennsylvania, USA
Falcon (15, 50 ml)	
Rundboden-Röhrchen	
6-well-Platten	Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
96-well-Rundboden-Platten	
96-well-ELISA-Flachboden-Platten	Corning, Corning, New York, USA
S-Monovette Lithium-Heparin	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Multifly Safety Kanülen	

2.3 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Konjugierter Fluoreszenzfarbstoff	Klon	Hersteller
CD14	FITC	61D3	eBioscience, San Diego, CA, USA
CD40	PE	5C3	
CD83	PE	HB15e	
CD273	PE	MIH18	
CD275	PE	MIH12	
CD69	APC	FN50	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland
CCR7	APC	FR11-11E8	
CD56	PE	B159	BD Biosciences, San Jose, California, USA
CD80	PE	L307.4	
CD86	FITC	2331(FUN-1)	
CD274	FITC	MIH1	
IFN- γ	FITC	25723.11	
CD276	FITC	MIH42	AbD Serotec. Oxford, UK
HLA-DR	APC	L203	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
CD3	PerCP/Cy5.5	HIT3a	Biolegend, San Diego, California, USA
monoclonal rabbit IgG	FITC	2A9	

Isotyp IgG1κ	FITC	EM-07	Acris Antibodies, Herford, Deutschland
Isotyp IgG1κ	APC	P3.6.2.8.1	eBioscience, San Diego, CA, USA
Isotyp IgG1κ	PE	P3.6.2.8.1	
Isotyp IgMκ	FITC	eBRM	
Isotyp IgG3κ	FITC	B10	
Isotyp IgG2bκ	FITC	MPC-11	

2.4 Antikörper für die Blockade-Assays

Antikörper	Klon	Hersteller
Anti-human IL12/IL23 p40/70	C8.6	eBioscience, San Diego, California, USA
Anti-human CD80	2D10	BioLegend, San Diego, California, USA
Anti-human CD86	IT2.2	BioLegend, San Diego, California, USA
Anti-human CD273	MIH18	eBioscience, San Diego, California, USA
Anti-human CD274	MIH1	
Anti-human CD275	MIH12	
Anti-human CD276	MIH35	
Anti-human CD152 (CTLA-4)	14D3	

2.5 Magnet-gekoppelte Antikörper (MicroBeads)

Beads	Hersteller
human CD3-Microbeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
anti-PE-Microbeads	

2.6 Kits

Produkt	Hersteller
Humaner IFN-γ-ELISA für natürliches oder rekombinantes IFN-γ: BD OptEIA Set Human IFN-γ	BD Bioscience, San Diego, California, USA
Substrat-Lösung: TMB Substrate	

Reagent Set for BD OptEIA	
---------------------------	--

2.7 Zytokine, Chemokine und Toll-like-Rezeptor-Liganden

Produkt	Hersteller
GM-CSF	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
rekombinantes humanes IL-1 β	
IL-2 (Proleukin S)	Cancernova GmbH onkologische Arzneimittel, Reute, Deutschland
rekombinantes humanes IL-4	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
rekombinantes humanes IL-6	
rekombinantes humanes IL-10	
rekombinantes humanes IL-12p70	eBioscience, San Diego, CA, USA
IFN- γ	Imukin; Boehringer Ingelheim Pharma, Ingelheim am Rhein, Deutschland
PGE ₂ (Prostin E2)	Pharmacia Ltd, Kent, UK
TNF- α	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
poly (I:C) (TLR-3-Ligand)	InvivoGen, San Diego, California, USA
R848 (TLR-7-Ligand)	

2.8 Chemikalien

Produkt	Hersteller
Formaldehyd (37%ig)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Perm/Wash-Buffer, Cytofix/Cytoperm-Solution	BD Biosciences, San Diego, California, USA
Brefeldin A (BFA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Monensin Natrium Salz	
DPBS (1x und 10x)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA Stock Solution, pH 7,2)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, pH 8,0, 0,5M)	Gibco, Invitrogen, Paisley, UK

Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ionomycin Calcium-Salz	
Trypanblau (0,5%ig in Kochsalzlösung)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

2.9 Medien

Produkt	Hersteller
very-low endotoxin RPMI 1640 Medium	Biochrom, Berlin, Deutschland
Humanserum (gepooltes Serum AB positiver, erwachsener Männer)	Institut für Transfusionsmedizin, Suhl, Deutschland

Zell-Medium wurde hergestellt aus very-low endotoxin RPMI 1640 Medium und 1,5% Humanserum.

2.10 Puffer

Name	Zusammensetzung
FACS-Puffer	DPBS + 0,5% BSA + 2mM EDTA
Fixationspuffer für FACS	FACS-Puffer + 2% Formaldehyd
Golgi-Stopp	BFA + Monensin
MACS-Puffer	DPBS + 0,5% BSA + 2mM EDTA
Wash-Puffer	10xPBS + 0,05% Tween 20+destilliertes Wasser
Stop Solution	2N H ₂ SO ₄
Coating Buffer	0,1 M Natriumcarbonat, pH 9,5
Assay bzw. Reagent Diluent	PBS + 10% FCS

2.11 Zellen

Alle Zellen stammen aus heparinisiertem peripheren Blut gesunder Spender.

2.12 Software-Programme

Software	Hersteller
ELISA Reader Sunrise und Magellan Data Analysis Software	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
FlowJo 8 software	Tree Star, Ashland, Oregon, USA
PASW Statistics 19	SPSS, an IBM Company, Chicago, Illinois, USA

3 Methoden

3.1 Dichtegradienten-Zentrifugation zur Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen

Zu Gewinnung peripherer mononukleärer Zellen (Lymphozyten und Monozyten, PBMC) macht man sich die unterschiedlichen Dichten der einzelnen Zellpopulationen zunutze, die wiederum verschiedene Sedimentations-Geschwindigkeiten bedingen. Das zu separierende Blut wird auf eine fertige Ficoll-Hypaque-Lösung gefüllt und zentrifugiert. Anschließend zeigte sich eine charakteristische Aufteilung des Blutes in verschiedene Schichten (Abb. 3.1). Mit einer Dichte von 1,077 g/ml besitzt die Ficoll-Hypaque-Lösung eine größere Dichte als Lymphozyten und Monozyten und Thrombozyten, jedoch eine geringere als Erythrozyten und Granulozyten. Deshalb pelletieren Erythrozyten und Granulozyten am Boden, während Lymphozyten und Monozyten sich zwischen Ficoll und Plasma anreichern. Thrombozyten verbleiben im Plasma.

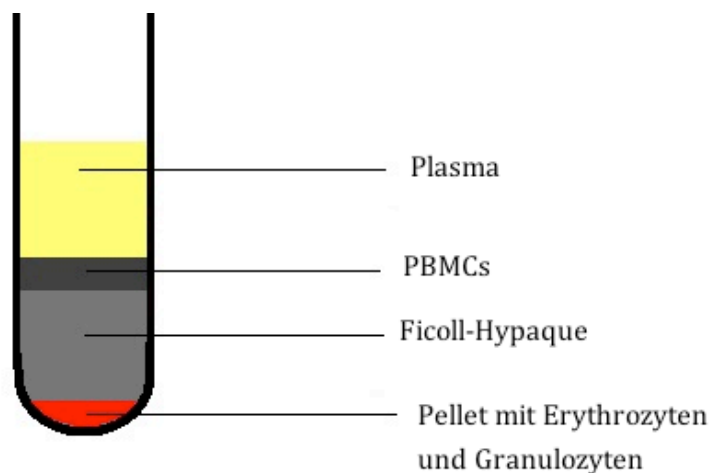


Abb. 3.1. Aufteilung des Blutes nach Ficoll-Separation

In dieser Arbeit wurde heparinisiertes Blut gesunder Spender in einem Verhältnis von 2:1 mit PBS verdünnt. 25 ml des verdünnten Blutes wurden dann auf 12 ml Ficoll-Hypaque-Lösung geschichtet und bei 840g für 36 Minuten zentrifugiert. Mithilfe einer Pasteurpipette wurden die PBMC abgenommen und in RPMI zweimal gewaschen, um einer Kontamination mit Thrombozyten vorzubeugen.

3.2 Zellzählung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer. Die zu zählenden Zellen wurden gewaschen und in RPMI resuspendiert. Nach gutem Durchmischen wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau gefärbt (2:1-Verdünnung) und in die Zählkammer gebracht. Anschließend wurden zwei Großquadrate unter einem Lichtmikroskop ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Die Anfärbung mit Trypanblau ermöglichte außerdem die Beurteilung der Vitalität der Zellen, da es nur in Zellen mit beschädigter Zellwand eindringt.

Die Gesamtzahl wurde mit folgender Formel errechnet:

Mittelwert der gezählten Zellzahl $\times 10^4 \times 2 \times \text{Vol. der Zellsuspension (ml)} = \text{Zellzahl}$

3.3 Gewinnung von Monozyten mittels Plastikadhärenz

Um aus den mononukleären Zellen Monozyten zu isolieren, machte man sich ihr Adhärenzverhalten an Plastik zu Nutzen. PBMC wurden für 1,5 Stunden auf 6-Well-Platten in einer Konzentration von $1-2 \times 10^7$ Zellen/Well in 3 ml DZ-Medium (Zell-Medium + 800 IU/ml GM-CSF und 580 IU/ml IL-4) bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Monozyten hafteten anschließend am Boden der Platten und konnten für die Gewinnung von DZ weiterverwendet werden.

Die nichtadhärenten Zellen (NAZ) wurden vorsichtig abgenommen und bei 37°C und 5% CO₂ aufbewahrt, bis sie 3 Tage später für die NK-Zell-Kokultur und T-Zell-Gewinnung weiterverwendet wurden.

3.4 Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten

Die isolierten Monozyten wurden für 3 Tage bei 37°C und 5% CO₂ in Zellmedium unter Hinzugabe von 800 IU/ml GM-CSF und 580 IU/ml IL-4 inkubiert.

Es wurden drei verschiedene Gruppen von DZ hergestellt, deren Herstellungsprozesse sich in der Zusammensetzung der aktivierenden Substanzen unterschieden. Diese Substanzen wurden jeweils für die letzten 24 Stunden zu den reifenden DZ hinzugefügt.

Die erste Gruppe wurde mit dem synthetischen TLR-3-Liganden poly-(I:C) (20 ng/ml) und dem TLR7/8-Liganden R848 (1 µg/ml) aktiviert. Außerdem wurden die Zytokine IL-1β (2000 IU/ml), PGE₂ (250 ng/ml), TNF-α (1100 IU/ml) und IFN-γ (5000 IU/ml) hinzugefügt. Diese DZ werden im weiteren Verlauf als TLR-DZ bezeichnet. Die zweite

Gruppe wurde mit dem konventionellen Zytokincocktail (cc-DZ) aktiviert, der erstmals von Jonuleit et al. 1997 beschrieben wurde. Er besteht aus den Zytokinen IL-1 β (2000 IU/ml), IL-6 (1100 IU/ml), PGE₂ (1000 ng/ml) und TNF- α (1100 IU/ml) (Jonuleit et al., 1997). Verglichen wurden diese beiden Gruppen mit tolerogenen DZ, die lediglich mit IL-10 (40 ng/ml) stimuliert wurden (IL-10-DZ).

Am Ende der 3 Tage wurden die reifen DZ geerntet, gewaschen und für die Kokulturen weiterverwendet.

	IL-4	GM-CSF	IL-6	PGE ₂	IL-1 β	TNF- α	INF- γ	IL-10	Poly-(I:C)	R848
TLR-DZ	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
cc-DZ	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
IL-10-DZ	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-

Tab. 3.1. Zusammensetzung des Zytokincocktails zur Generierung der verschiedenen DZ-Subpopulationen

3.5 Isolierung von CD3⁺ T-Zellen mittels magnetischer Zellseparation

Aus den NAZ, die nach der Isolierung der Monozyten aus den PBMC übrigblieben, wurden mittels magnetischer Zellseparation (MACS, engl. *magnetic activated cell sorting*) T-Zellen isoliert. Die Methode folgt folgendem Prinzip: Man wählt ein für die zu isolierende Zellpopulation spezifisches Oberflächenmolekül aus und markiert es mit einem Antikörper, an den magnetische Beads gekoppelt sind. Die Zellsuspension wird anschließend durch eine Säule in einem starken Magnetfeld geschickt, sodass die markierten Zellen zurückgehalten werden, während alle anderen Zellen durchfließen. Entfernt man dann das Magnetfeld, können die selektierten Zellen aufgefangen werden. In diesem Fall wurde für die Isolierung von T-Zellen das magnetische Zellsortierungskit der Firma Miltenyi Biotec verwendet mit Magnetbead-gekoppelten Antikörpern gegen CD3, einem Korezeptor für den T-Zell-Rezeptor. Die NAZ wurden gewaschen und in MACS-Puffer resuspendiert (80 μ l / 1×10^7 Zellen). Dann wurden die Zellen 15 min bei 4°C mit CD3-Beads (20 μ l / 1×10^7 Zellen) inkubiert und auf die Säule im Magnetfeld geladen. Nach drei Waschschritten wurde das Magnetfeld entfernt und die CD3-selektierten Zellen konnten aufgefangen werden.

3.6 Autologe Kokultur von T-Zellen und dendritischen Zellen

Es wurde eine Kokultur angelegt mit autologen CD3⁺ Zellen (2×10⁵ Zellen/well) und DZ (3×10⁴ Zellen/well) über 4 Tage bei 37°C und 5% CO₂ in 96-well-Platten mit 200 µl DZ-Medium. Als Negativkontrolle wurden CD3⁺ Zellen ohne DZ verwendet. Für die Blockade-Assays wurden anti-IL-12/IL-23p40/70-Antikörper, anti-CD80-, anti-CD86-Antikörper, anti-CD273-, anti-CD274-, anti-CD275- sowie anti-CD274-Antikörper jeweils in einer Konzentration von 10 µg/ml hinzugefügt, der anti-CTLA-4-Antikörper wurde in einer Konzentration von 1,25 µg/ml hinzugefügt. Nach 4 Tagen wurden die Überstände abgenommen und mittels ELISA auf IFN-γ analysiert.

3.7 Autologe Kokultur von NK-Zellen und dendritischen Zellen

Die autologen NAZ wurden gewaschen und gezählt. Es wurde eine Kokultur auf einer 96-well-Platte angelegt mit frisch geernteten DZ (3×10⁴ Zellen/well) und NAZ (3×10⁵ Zellen/well). Zu allen Wells wurde IL-2 in einer Konzentration von 1000 IU/ml hinzugefügt. Für die Durchführung der IL-12-Blockade wurde zu einigen Wells IL-12/IL-23-p40/70-Antikörper hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 19 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ wurden zur Positivkontrolle Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA, 10 ng/ml) und Ionomycin (1 µg/ml) hinzugefügt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 20 Stunden wurde ein Golgi-Stop durchgeführt (Monensin 25 µM + Brefeldin A 10 µg/ml). Anschließend wurden die Zellen für weitere 4 Stunden bebrütet. Die Überstände wurden gesammelt und später mittels ELISA auf die IFN-γ-Produktion untersucht. Die Zellen wurden geerntet, gewaschen und mittels Durchflusszytometrie auf die intrazelluläre IFN-γ-Konzentration untersucht.

3.8 Bestimmung der Interferon-γ-Konzentration mittels ELISA

Der ELISA (engl. *enzyme linked immunosorbent assay*) ermöglicht die quantitative Bestimmung eines Antigens in einer Probe. In diesem Fall wurden die Überstände der einzelnen Kokulturen auf ihre IFN-γ-Konzentration untersucht.

Es wurde das ELISA-Set der Firma BD OptEIA verwendet. Der IFN-γ-spezifische Coating-Antikörper wurde auf eine 96-well-Platte gegeben und über Nacht bei 4°C gelagert. Dies diente dem Haften des Coating-Antikörpers an der Oberfläche der Platte. Am nächsten Tag wurden jeweils 100 µl/Well der zu untersuchenden Überstände in Dublikaten auf die ELISA-Platte gefüllt und anschließend zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

In dieser Zeit findet die Bindung des Antigens, in diesem Fall IFN- γ , an den an der Platte haftenden Coating-Antikörper statt. Nach mehreren Waschschrritten wurde ein zweiter Antikörper, der sog. Detection-Antikörper, hinzugegeben. Dieser soll an ein zweites Epitop des Coating-Antikörpers binden und enthält außerdem ein Marker-Enzym, Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase. Nach erneuter Inkubationszeit wird ein zu dem Enzym passendes Substrat hinzugegeben, welches einen messbaren Farbumschlag von gelb zu blau bewirkt. Die Farbintensität wurde anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen, wobei die Farbintensität mit der IFN- γ -Konzentration korrelierte. Anhand einer Standard-Verdünnungsreihe, die für jede ELISA-Platte mit bekannten Zytokinmengen in aufsteigender Konzentration angelegt wurde, war es möglich, die IFN- γ -Konzentration der einzelnen Überstände genau zu bestimmen.

3.9 Durchflusszytometrie

Das Verfahren der Durchflusszytometrie dient der phänotypischen Analyse großer Zellzahlen. Die einzelnen Zellen werden hierbei nacheinander durch eine Kapillare gesaugt und passieren einen Laserdetektor. Dabei werden sie von einem Laser angestrahlt und ihre Lichtstreuung in zwei verschiedenen Richtungen photometrisch gemessen. Neben der Streuung in die Vorwärtsrichtung (engl. *forward scatter*), welche Rückschlüsse auf die Größe der Zelle zulässt, wird zum anderen die Streuung um 90° in die Seitwärtsrichtung (engl. *side scatter*) gemessen, welche eine Aussage über ihre Granularität (innere Zellstruktur) erlaubt. Anhand dieser beiden Kriterien können verschiedene Zellpopulationen ausgewählt und von einander unterschieden werden.

Wird die Zelloberfläche zusätzlich mit Fluorochromen markiert, kann anhand der Emission des Lichtes eine Aussage über die Oberflächenmoleküle der Zelle getroffen werden, was eine weitere Sortierung der Zellen ermöglicht. Ein Laserstrahl regt die an Antikörper gebundenen Fluorochrome zur Emission von Licht an und sammelt dieses durch eine Linse. Verschiedene Filter können das Licht wiederum anhand der verschiedenen Wellenlängen trennen und zu unterschiedlichen Detektoren lenken. Das emittierte Fluoreszenzlicht verhält sich proportional zur Zahl der gebundenen Fluorochrom-Moleküle. Tabelle 3.2 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe mit ihren jeweiligen maximalen Absorptions- und Emissions-Wellenlängen (Luttmann et al., 2009, S. 79).

Fluorochrome	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
Phycoerythrin (PE)	565 nm	615 nm
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	495 nm	519 nm
Allophycocyanin (APC)	650 nm	660 nm
Peridinin-Chlorophyll-A-Protein (PerCP)	482 nm	678 nm

Tab. 3.2. Übersicht über die verwendeten Fluorochrome mit ihren Absorptions- und Emissionsmaxima

Mithilfe der Durchflusszytometrie konnten in dieser Arbeit die einzelnen Zellpopulationen bezüglich ihrer Reinheit und Vitalität beurteilt werden. Außerdem wurde die Methode verwendet, um das Oberflächenprofil der DZ sowie die intrazelluläre IFN- γ -Konzentration der durch DZ aktivierten NK-Zellen zu bestimmen.

Abb. 3.2. zeigt exemplarisch anhand eines Spenders, wie sich durch die Durchflusszytometrie die Population der dendritischen Zellen klar isolieren lässt, und anschließend weiter auf die beiden Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 untersucht werden konnte.

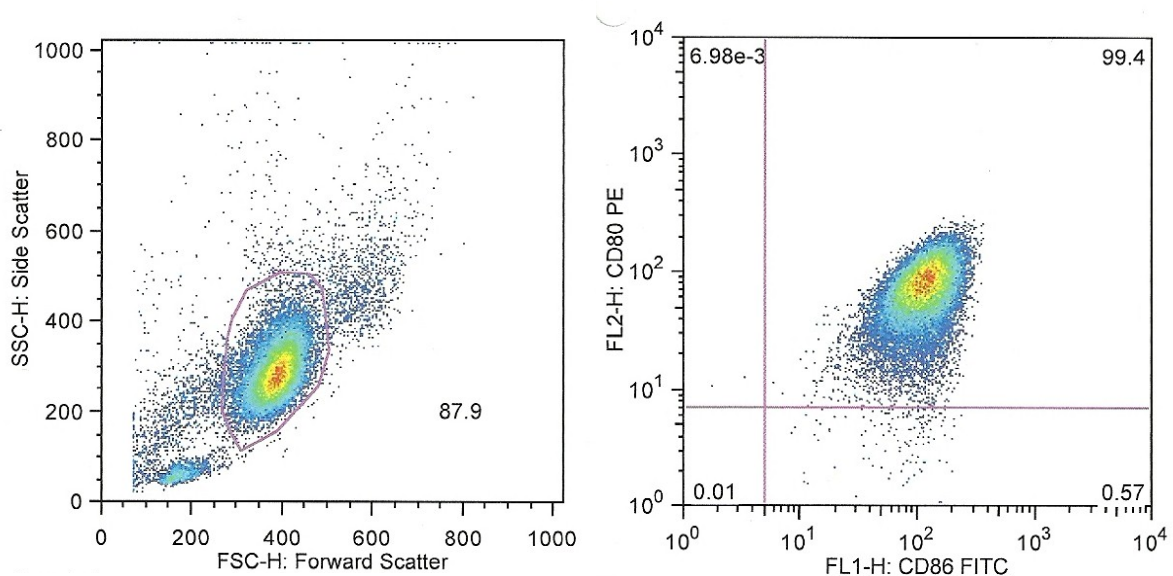


Abb. 3.2. Isolation der DZ-Subpopulation mittels Durchflusszytometrie (links) und anschließende Bestimmung der Fluoreszenzintensität nach Markierung mit den Antikörpern anti-CD86-FITC und anti-CD80-PE (rechts)

3.9.1 Immunphänotypisierung von dendritischen Zellen

Für die Bestimmung des Expressionsprofils der DZ mittels Durchflusszytometrie wurden zwischen 5×10^4 und 1×10^5 Zellen pro Analyseröhrchen eingesetzt. Die Zellen wurden zentrifugiert (4 min, 1500 rpm, bei Raumtemperatur) und der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wurde gewaschen, indem es zweimal in 3 ml FACS-Puffer aufgenommen und dieser anschließend abzentrifugiert wurde. Das gereinigte Zellpellet wurde nun in einem Vielfachen von 100 μ l FACS-Puffer aufgenommen, um später 100 μ l pro Antikörperfärbung und Röhrchen einzusetzen. Zusätzlich wurden 20 μ l Maus-IgG Antikörper hinzugegeben. Diese sollten eine Blockade der Fc-Rezeptoren an der Oberfläche bewirken, um so eine unspezifische Bindung der Fluoreszenzantikörper an die Zelloberfläche zu verhindern (sog. Fc-Block).

In die für die Analyse vorgesehenen Röhrchen wurden die FITC- (CD86, CD274, CD275, CD14), PE- (CD83, CD273, CD275, CD40) und APC- (CCR7, HLA-DR) konjugierten Antikörper vorgelegt und anschließend je 100 μ l der Zellsuspension pro Röhrchen hinzu pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 4°C wurde zu den einzelnen Analyseröhrchen 1 ml FACS-Puffer hinzugegeben und danach abzentrifugiert (4 min, 1500 rpm, bei Raumtemperatur), um so die ungebundenen Antikörper zu entfernen. Das verbleibende Zellpellet wurde für die Analyse in 300 μ l FACS-Puffer gelöst. Anschließend wurden die Proben gemessen.

3.9.2 Intrazelluläre IFN- γ -Färbung

Für die intrazelluläre IFN- γ -Färbung wurden die Zellen im Anschluss der 24-stündigen Kokultur von DZ und NK-Zellen abgenommen und mit jeweils 100 μ l PBS gewaschen. Auch hier wurde wie bereits beschrieben ein Fc-Block durchgeführt. Anschließend folgte eine Färbung mit CD8-PE-, CD4-PerCP- und CD3-APC-Antikörpern (jeweils 2,5 μ l pro Röhrchen). Vor der intrazellulären IFN- γ -Färbung mussten die Zellen erst permeabel gemacht werden, wofür sie zunächst mit 250 μ l Fix-Perm-Lösung für 20 min bei 4°C inkubiert wurden und nach einmaligem Waschen dann 5 Minuten mit Perm-Puffer unter denselben Bedingungen ruhen sollten. Anschließend wurden 10 μ l IFN- γ -FITC-Antikörper zu den Röhrchen gegeben, für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert und zuletzt zweimal gewaschen. Dann erfolgte die Messung am Durchflusszytometer.

3.10 Statistische Analyse

Die Ergebnisse wurden statistisch unter Verwendung des Wilcoxon-Sign-Rank-Tests ausgewertet, da es sich bei den erhobenen Daten nicht um normalverteilte, jedoch um miteinander verbundene Daten handelte. Die Berechnungen erfolgten mittels des Statistikprogrammes SPSS, Version 21. Ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet, unter 0,01 als hochsignifikant.

Dargestellt sind die Ergebnisse in sog. Box-Whisker-Plots. Die Box enthält die mittleren 50% der Daten. Die obere und untere Begrenzung entsprechen jeweils dem oberen und unteren Quartil. Der Median wird als Strich gekennzeichnet. Die Antennen (engl. *Whiskers*) kennzeichnen Werte, die außerhalb der Box liegen. Die Länge der Antennen entspricht maximal dem 1,5-fachen des Interquartilabstands und endet bei dem letzten innerhalb dieser Grenze liegenden Wert. Ausreißer werden separat durch Kreise angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Differenzierung von naiven T-Zellen zu T_H1-Zellen durch dendritische Zellen

Zu Beginn wurde untersucht, ob die *in vitro* gereiften DZ eine Differenzierung von naiven T-Zellen zu T_H1-Zellen hervorrufen können. Dieser Prozess wird im weiteren Verlauf als T_H1-Polarisierung bezeichnet. Als Indikator für eine stattgefundene T_H1-Polarisierung diente die IFN- γ -Konzentration, die am Ende der viertägigen Kokultur mittels IFN- γ -ELISA bestimmt wurde.

Die T-Zellen, die mit TLR-DZ zusammen inkubiert wurden, produzierten die größte Menge an IFN- γ . Bei 16 Spendern kam es zu einer signifikanten Erhöhung der IFN- γ -Konzentration (Mittelwert=10972 pg/ml) verglichen mit der Negativkontrolle (Mittelwert=88 pg/ml; p=0,001). Auch in der Kokultur zwischen T-Zellen und cc-DZ zeigte sich bei allen 12 Spendern eine signifikante Erhöhung der IFN- γ -Konzentration gegenüber der Negativkontrolle (Mittelwert= 5444 pg/ml; p=0,001). Im Vergleich zu den durch TLR-DZ aktivierten T-Zellen war die IFN- γ -Produktion jedoch deutlich niedriger (p=0,001; n=12). Die IFN- γ -Konzentration der T-Zellen, die zusammen mit IL-10-DZ inkubiert wurden, war bei vier Spendern nur minimal erhöht (Mittelwert=177 pg/ml) und zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Negativkontrolle (Abb. 4.1).

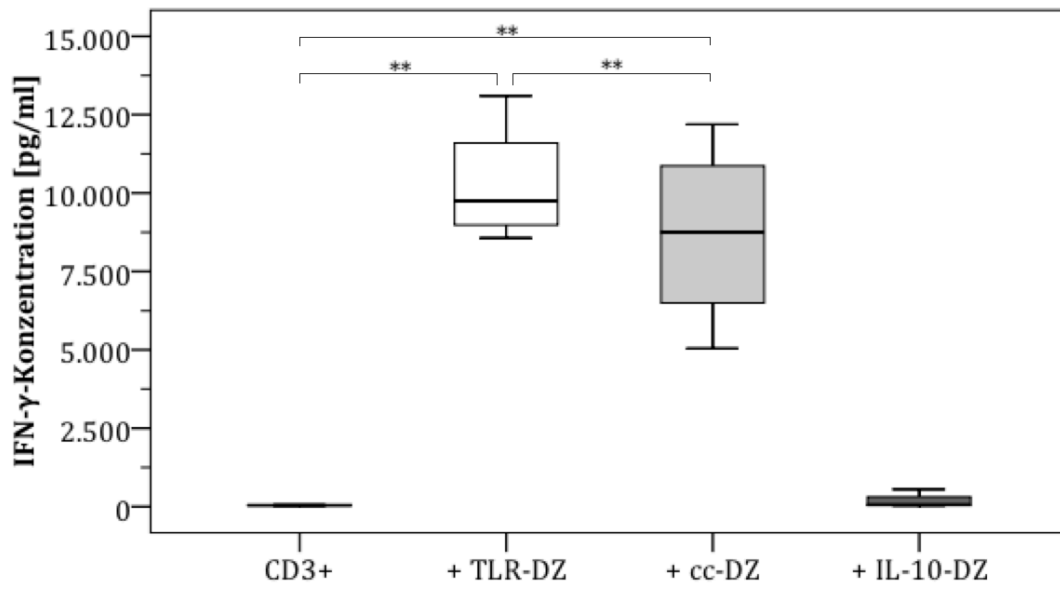


Abb. 4.1. T_H1 -Polarisierung durch TLR-DZ, cc-DZ und IL-10-DZ

Aus peripherem Blut von 4 gesunden Spendern wurden TLR-, cc- und IL-10-DZ gewonnen und mit $CD3^+$ autologen T-Zellen für 4 Tage inkubiert. Als Negativkontrolle diente eine reine T-Zell-Kultur. Die Überstände wurden anschließend mittels ELISA auf IFN- γ -Produktion analysiert.

*, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$.

4.1.1 Einfluss von IL-12 auf die T_H1 -Polarisierung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass TLR-DZ und cc-DZ eine Differenzierung zu T_H1 -Zellen hervorrufen, wurde nun untersucht, wodurch diese T_H1 -Polarisierung vermittelt wird. Bei der Differenzierung naiver T-Zellen zu Effektorzellen ist die Interleukin-Sekretion durch die DZ ein wichtiger Faktor. Aus vorherigen Experimenten war bekannt, dass TLR-DZ IL-12 produzieren, sodass mithilfe einer IL-12-Blockade während der Kokultur der Einfluss von IL-12 auf die T_H1 -Polarisierung ermittelt werden sollte. Bei gleichen Versuchsbedingungen wurde zu Beginn der viertägigen Kokultur ein humaner Antikörper gegen IL12/IL23 p40/70 in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ zu einigen Wells hinzugefügt. Die Auswertung fand ebenfalls mittels IFN- γ -ELISA statt. Die IL-12-Blockade wurde für alle 3 DZ-Typen, also TLR-, cc- und IL-10-DZ, im Vergleich untersucht.

Die T-Zellen, die mit TLR-DZ aktiviert wurden, zeigten nach IL-12-Blockade bei 16 Spendern eine signifikante Abnahme der IL-12-Produktion (Mittelwert=4451 pg/ml ; $p=0,001$). Auch die T-Zellen, die mit cc-DZ aktiviert wurden, wiesen bei 12 Spendern

eine signifikante, allerdings etwas weniger deutliche Abnahme der IFN- γ -Konzentration nach IL-12-Blockade auf (Mittelwert=3416 pg/ml; $p=0,027$; Abb. 4.2).

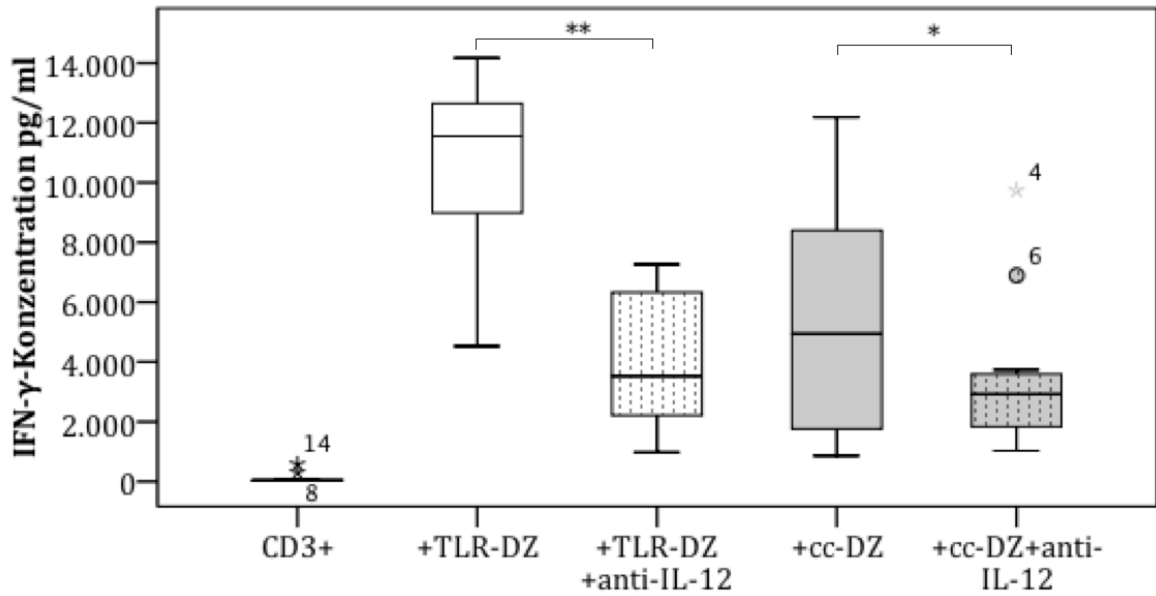


Abb. 4.2. IFN- γ -Produktion von T-Zellen durch TLR-DZ bzw. cc-DZ jeweils vor und nach IL-12-Blockade

CD3⁺-T-Zellen von 12 gesunden Spendern wurden mit autologen TLR- und cc-DZ für 4 Tage inkubiert, sowohl mit als auch ohne anti-IL-12-Antikörper. Als Negativkontrolle diente eine reine T-Zell-Kultur. Die Überstände wurden anschließend mittels ELISA auf ihre IFN- γ -Konzentration untersucht. *, $p<0,05$, **, $p<0,01$.

In der Kokultur zwischen T-Zellen und IL-10-DZ kam es nach IL-12-Blockade zu keiner Änderung der IFN- γ -Konzentration. Dies war jedoch zu erwarten, denn wie zuvor beschrieben haben die IL-10-DZ auch ohne IL-12-Blockade keine IFN- γ -Produktion bei den T-Zellen hervorgerufen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die T_H1-Polarisierung durch die TLR-DZ zu einem großen Teil von IL-12 abhängig ist. Allerdings konnte eine IL-12-Blockade die IFN- γ -Produktion nicht vollständig verhindern, was vermuten lässt, dass neben IL-12 noch andere Faktoren bei der T_H1-Polarisierung eine Rolle spielen. Diese Vermutung wird noch verstärkt durch die Ergebnisse der T-Zellen, die durch cc-DZ aktiviert wurden. Denn obwohl cc-DZ kaum IL-12 produzieren, haben sie dennoch eine Differenzierung zu T_H1-Zellen hervorgerufen.

4.1.2 Einfluss von CD80 und CD86 auf die T_H1-Polarisierung

Ein wichtiges Kennzeichen reifer DZ ist die starke Expression der beiden kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 aus der B7-Familie. Dies lässt vermuten, dass auch sie eine große Rolle bei der Differenzierung von naiven T-Zellen zu T_H1-Zellen spielen könnten. Um den genauen Einfluss von CD80 und CD86 bei der T_H1-Polarisierung zu untersuchen, erfolgte während der Kokultur zwischen T-Zellen und DZ eine Blockade von CD80 und CD86 mit den humanen Antikörpern anti-CD80 und anti-CD86, jeweils in einer Konzentration von 10 µg/ml. Anschließend wurden die Überstände entnommen und mittels eines IFN-γ-ELISA ausgewertet. Die CD80/CD86-Blockade wurde für alle 3 DZ-Typen vergleichend untersucht (TLR-, cc- und IL-10-DZ).

Zuvor wurden die DZ auf ihr Oberflächenprofil analysiert, um festzustellen, wie ausgeprägt ihre Expression von CD80 und CD86 ist. Dafür wurde ein Teil der ausgereiften DZ mit fluoreszenzkonjugierten monoklonalen Antikörpern gegen CD83, CCR7, CD14, CD40, HLA-DR, CD80 und CD86 gefärbt. Anschließend erfolgte die Auswertung mittels Durchflusszytometrie. Aus dem Verhältnis der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der gemessenen Population und der MFI der Zellen, die mit dem entsprechenden Isotyp-Antikörper gefärbt wurden, wurde die relative MFI errechnet. Sowohl TLR- also auch cc-DZ zeigten eine starke Expression von CD80 und CD86 auf ihrer Zelloberfläche, wobei die CD86-Expression bei beiden DZ-Typen gegenüber der CD80-Expression deutlich überwog. IL-10-DZ zeigten hingegen eine nur geringe Expression beider Oberflächenrezeptoren (Abb. 4.3).

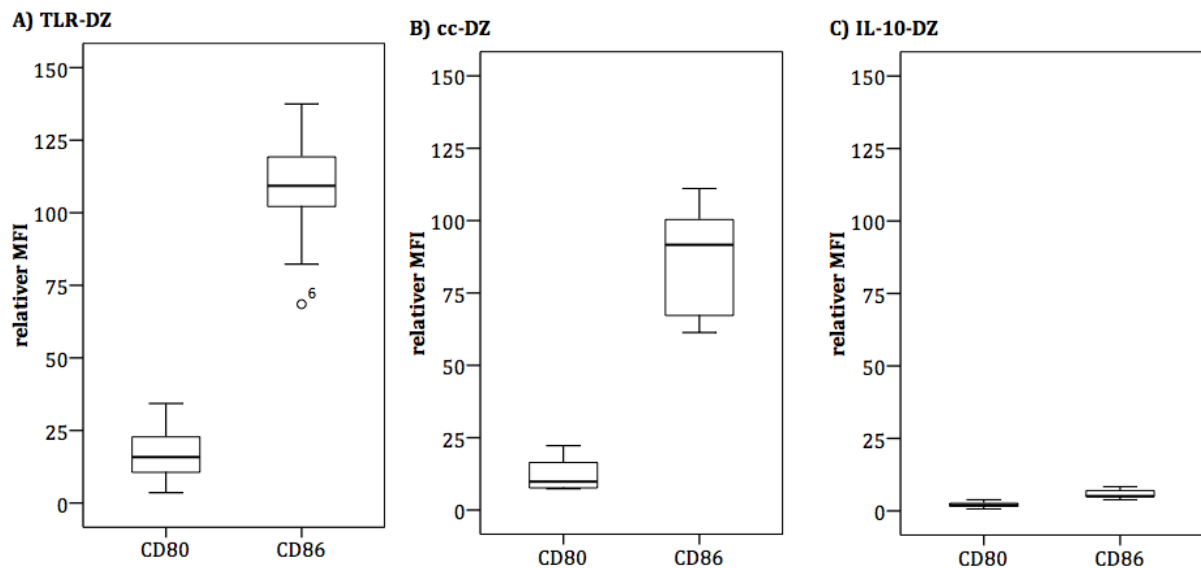


Abb. 4.3. Expression von CD80 und CD86 auf der Oberfläche von TLR-, cc- und IL-10-DZ

Aus peripherem Blut gesunder Spender wurden DZ gewonnen und anschließend mittels Durchflusszytometrie auf ihr Oberflächenprofil für kostimulatorische Marker analysiert. A) TLR-DZ; n=10 B) cc-DZ; n= 8 C) IL-10-DZ; n=7.

Mit den restlichen DZ wurde, wie oben beschrieben, eine Kokultur mit autologen T-Zellen, teilweise mit Blockade von CD80 und CD86, angelegt. Zum Vergleich erfolgte parallel eine IL-12-Blockade nach dem oben beschriebenen Prinzip.

Eine Blockade von CD80 bei den TLR-DZ führte, im Vergleich zur reinen Kokultur zwischen T-Zellen und TLR-DZ (Mittelwert=10972 pg/ml, n=16), zu keiner signifikanten Veränderung der IFN- γ -Konzentration (Mittelwert=12156 pg/ml, n=10). Das heißt, die Blockade von CD80 konnte die Differenzierung zu T_H1-Zellen weder verhindern noch vermindern. Eine CD86-Blockade hingegen bewirkte eine signifikante Abnahme der IFN- γ -Konzentration (Mittelwert=4187 pg/ml; n=10; p=0,005). Verglichen mit der Negativkontrolle (Mittelwert=88 pg/ml, n=16) konnte die Blockade von CD86 jedoch keine vollständige Suppression der IFN- γ -Produktion herbeiführen (p=0,005).

Die Kombination von blockierenden Antikörpern gegen CD80 und CD86 führte ebenfalls zu einer Abnahme der IFN- γ -Konzentration (Mittelwert=1763 pg/ml, n=10; p=0,001). Im Vergleich zur alleinigen CD86-Blockade kam es zu einer signifikant niedrigeren IFN- γ -Konzentration (p=0,042). Eine vollständige Suppression der IFN- γ -Produktion konnte jedoch auch hier nicht erreicht werden. Deshalb erfolgte in einem nächsten Schritt die zusätzliche Blockade mit anti-IL-12. Dies bewirkte, im Vergleich zu TLR-DZ

ohne Blockade, eine signifikante Reduktion der IFN- γ -Produktion (Mittelwert=148 pg/ml; n=10; p=0,001). Durch die Kombination der 3 blockierenden Antikörper gegen CD80, CD86 und IL-12 konnte die IFN- γ -Konzentration auf das Niveau der Negativkontrolle reduziert werden, das heißt eine Differenzierung von naiven T-Zellen zu T_H1-Zellen vollständig supprimiert werden (Abb. 4.4).

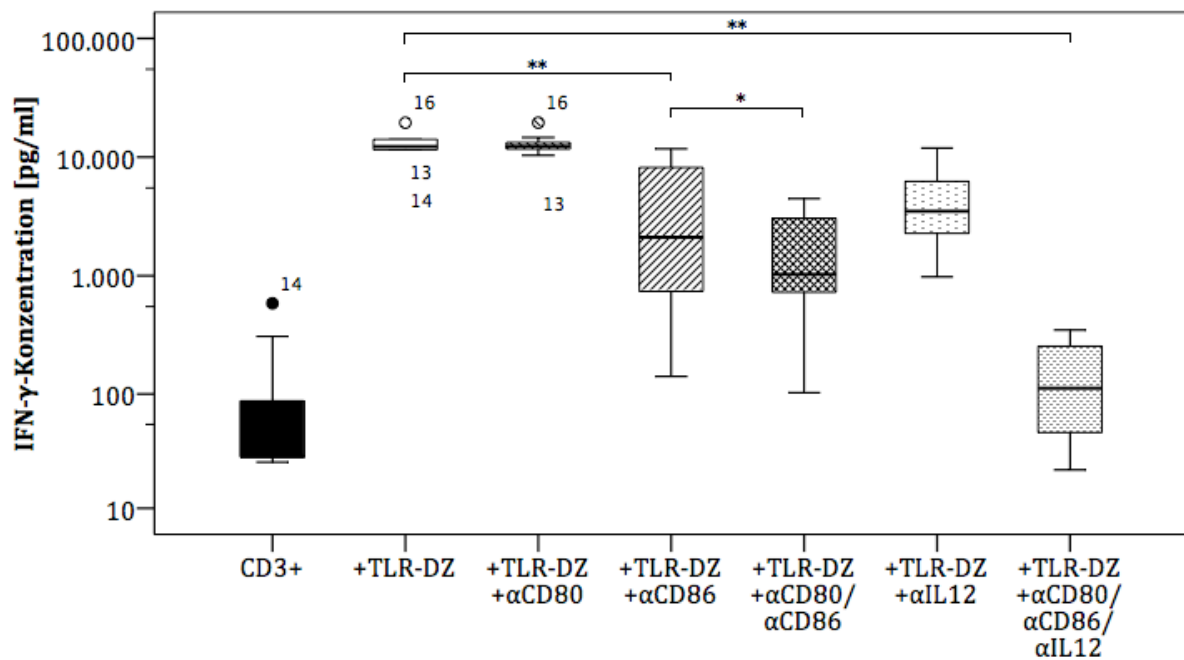


Abb. 4.4. Einfluss der IL-12- und CD80-/CD86-Blockade auf die T_H1-Polarisierung durch TLR-DZ CD3⁺ T-Zellen von 10 gesunden Spendern wurden mit autologen TLR-DZ inkubiert, teils alleine teils unter Hinzugabe von blockierenden Antikörpern gegen IL-12, CD80 und/oder CD86. Als Negativkontrolle diente eine reine T-Zell-Kultur. Anschließend wurden die Überstände mittels ELISA auf die IFN- γ -Konzentration untersucht. *, p<0,05, **, p<0,01.

Ein ähnliches Muster ergab sich bei den Versuchen mit cc-DZ. Die Blockade von CD80 (Mittelwert=7473 pg/ml; n=8) zeigte keine signifikante Abnahme der IFN- γ -Produktion im Vergleich zur Kokultur ohne Blockade-Antikörper (Mittelwert=5444 pg/ml; n=12). Dagegen führte eine CD86-Blockade zu einer deutlichen Abnahme der IFN- γ -Produktion (Mittelwert=239 pg/ml; n=8; p=0,004). Bei den cc-DZ war der Effekt der CD86-Blockade deutlich stärker als bei den TLR-DZ und bewirkte eine vollständige Reduktion der IFN- γ -Produktion auf das Niveau der Negativkontrolle (Mittelwert=88 pg/ml; n=16). Die Kombination von anti-CD80 und -CD86 führte ebenfalls zu einer Senkung der IFN- γ -Konzentration auf das Niveau der Negativkontrolle (Mittelwert=130 pg/ml, n=8).

Zwischen der CD80-Blockade und der CD86-Blockade zeigte sich wie bei den TLR-DZ ein signifikanter Unterschied in der Wirkung auf die IFN- γ -Produktion ($p=0,012$). Auch die Zugabe von anti-IL-12 ergab ähnliche Ergebnisse (Mittelwert=112 pg/ml, $n=8$), die IFN- γ -Produktion wurde vollständig supprimiert (Abb. 4.5).

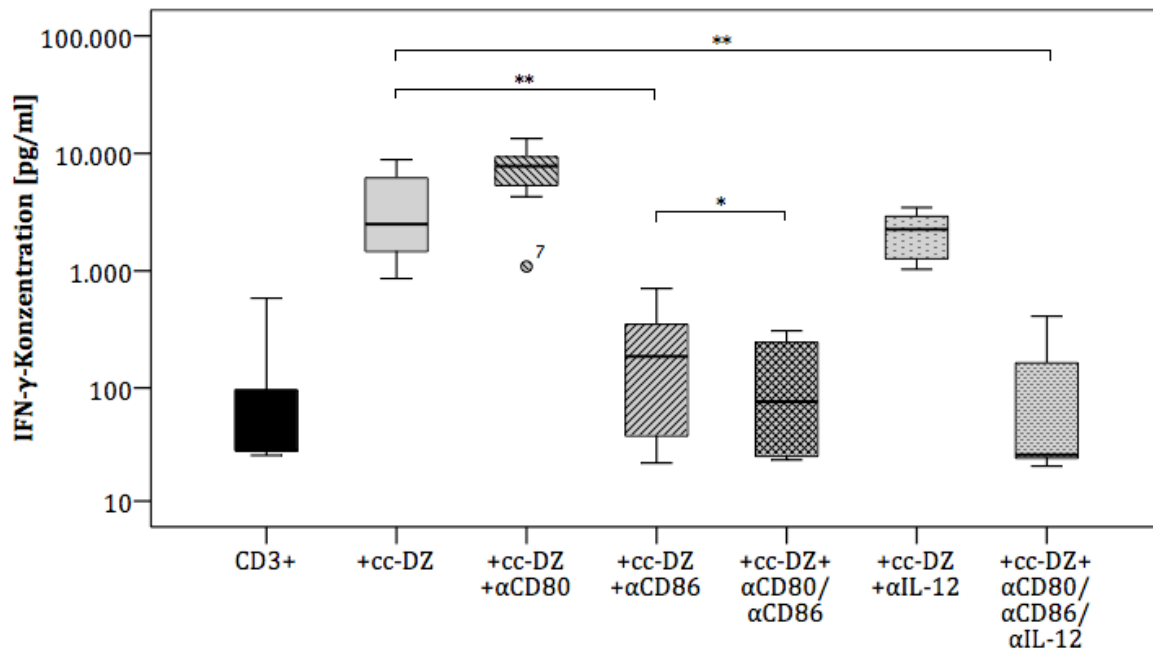


Abb. 4.5. Einfluss der IL-12- und CD80-/CD86-Blockade auf die T_H1 -Polarisierung durch cc-DZ CD3⁺ T-Zellen von 8 gesunden Spendern wurden mit autologen cc-DZ inkubiert, teils alleine teils unter Hinzugabe von blockierenden Antikörpern gegen IL-12, CD80 und/oder CD86. Als Negativkontrolle diente eine reine T-Zell-Kultur. Anschließend wurden die Überstände mittels ELISA auf die IFN- γ -Konzentration untersucht. *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$.

Die Versuche wurden ebenfalls mit IL-10-DZ durchgeführt. Da es auch ohne Blockade von Rezeptoren nicht zu einer T_H1 -Polarisierung kam, blieb die Blockade von CD80 und CD86 ohne Effekt.

4.1.3 Einfluss der koinhibitorischen Moleküle CD273, CD274, CD275 und CD276 auf die T_H1 -Polarisierung

Der B7-Familie gehören neben CD80 und CD86 die Oberflächenmoleküle CD273, CD274, CD275 und CD276 an. Im Gegensatz zu CD80 und CD86 wirken sie überwiegend inhibitorisch. In den folgenden Versuchen wurde geprüft, ob eine Blockade dieser Moleküle zu einer stärkeren T_H1 -Polarisierung führt, gekennzeichnet durch einen Anstieg der IFN- γ -Konzentration.

Die DZ wurden auch diesmal zunächst auf ihr Oberflächenprofil analysiert, um festzustellen, ob sie CD273, CD274, CD275 und CD276 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Dafür wurde ein Teil der ausgereiften DZ mit fluoreszenzkonjugierten monoklonalen Antikörpern gegen CD83, CCR7, CD14, CD40, HLA-DR, CD273, CD274, CD275 und CD276 gefärbt. Anschließend erfolgte die Analyse mittels Durchflusszytometrie und die Berechnung der relativen MFI, wie bereits zuvor beschrieben wurde. Alle 3 DZ-Typen zeigten ein ähnliches Expressionsmuster der 4 Moleküle. CD274 wurde bei allen am stärksten exprimiert (Abb. 4.6); CD273, CD275 und CD276 zeigten eine deutlich niedrigere relative MFI, waren aber auf allen Zellen nachweisbar (Abb. 4.7).

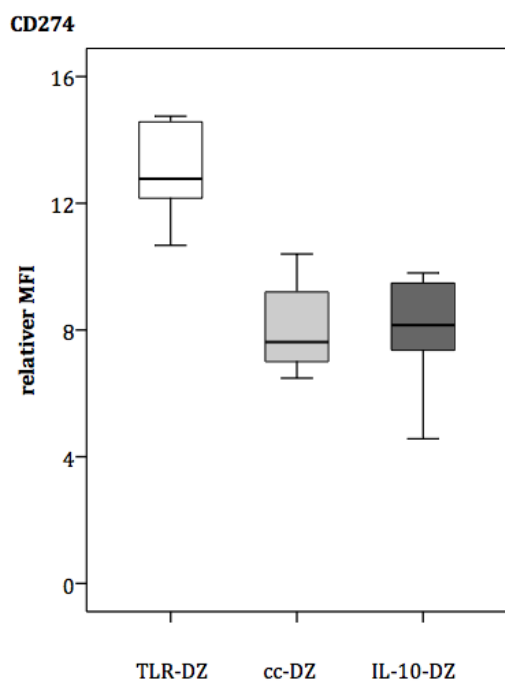


Abb. 4.6. Expression von CD274 auf der Oberfläche von TLR-, cc- und IL-10-DZ

Aus peripherem Blut 6 gesunder Spender wurden DZ gewonnen und anschließend mittels Durchflusszytometrie auf ihr Oberflächenprofil für koinhibitorische Marker analysiert.

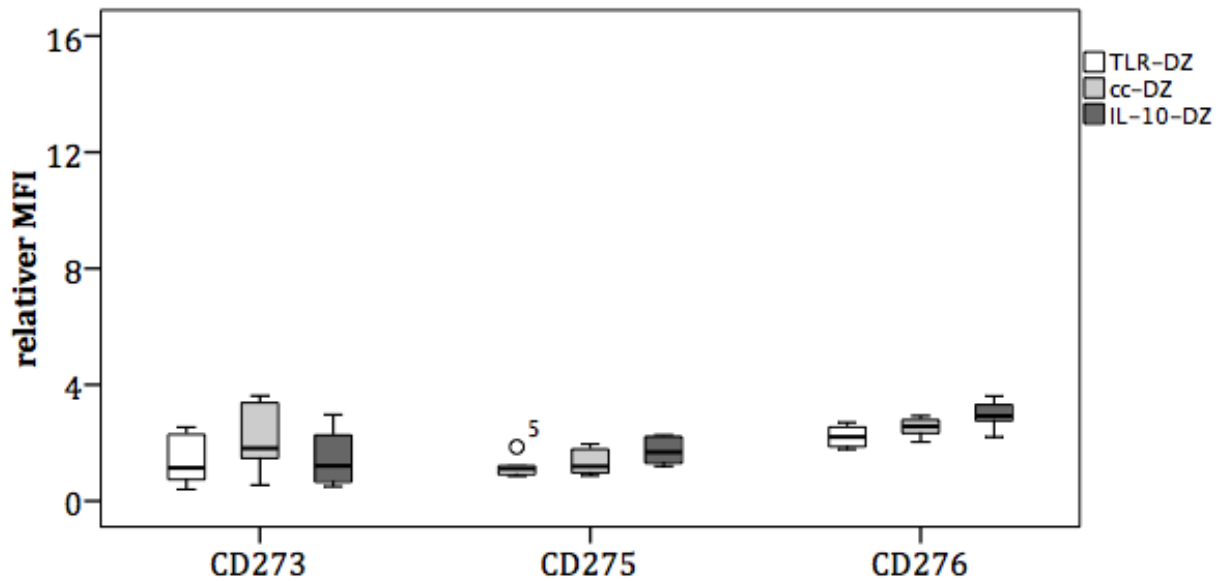


Abb. 4.7. Expression von CD273, CD275 und CD276 auf der Oberfläche von TLR-, cc- und IL-10-DZ

Aus peripherem Blut 6 gesunder Spender wurden DZ gewonnen und anschließend mittels Durchflusszytometrie auf ihr Oberflächenprofil für koinhibitorische Marker analysiert.

Mit den restlichen DZ, die nach der Phänotyp-Bestimmung übrig blieben, wurde erneut eine Kokultur mit CD3⁺ T-Zellen und autologen DZ angelegt. Die Versuchsbedingungen ähnelten denen bei der IL-12-Blockade, nur wurden diesmal blockierende humane Antikörper gegen CD273, CD274, CD275 und CD276 eingesetzt, in einer Konzentration von jeweils 10 µg/ml.

Die Blockade von CD274 bei TLR-DZ führte bei sechs Spendern zu einer signifikanten Erhöhung der IFN- γ -Konzentration (Mittelwert=64736 pg/ml; p=0,016). Eine Blockade von CD273 hingegen hatte keinen signifikanten Einfluss auf die IFN- γ -Produktion durch die T-Zellen (Mittelwert=46980 pg/ml, p=0,281). Die Kombination beider blockierender Antikörper führte ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung der IFN- γ -Konzentration (Mittelwert= 80883 pg/ml; p=0,016). Verglichen mit der alleinigen CD274-Blockade ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied (p=0,219; Abb. 4.8). Sowohl die alleinige Blockade von CD275 (Mittelwert=58349 pg/ml, n=2) und CD276 (Mittelwert=73198 pg/ml, n=2) als auch die Kombination aller vier Antikörper (Mittelwert=81416 pg/ml; n=2) führten zu einer Erhöhung der IFN- γ -Konzentration, die jedoch aufgrund der geringen Fallzahl nicht statistisch signifikant war.

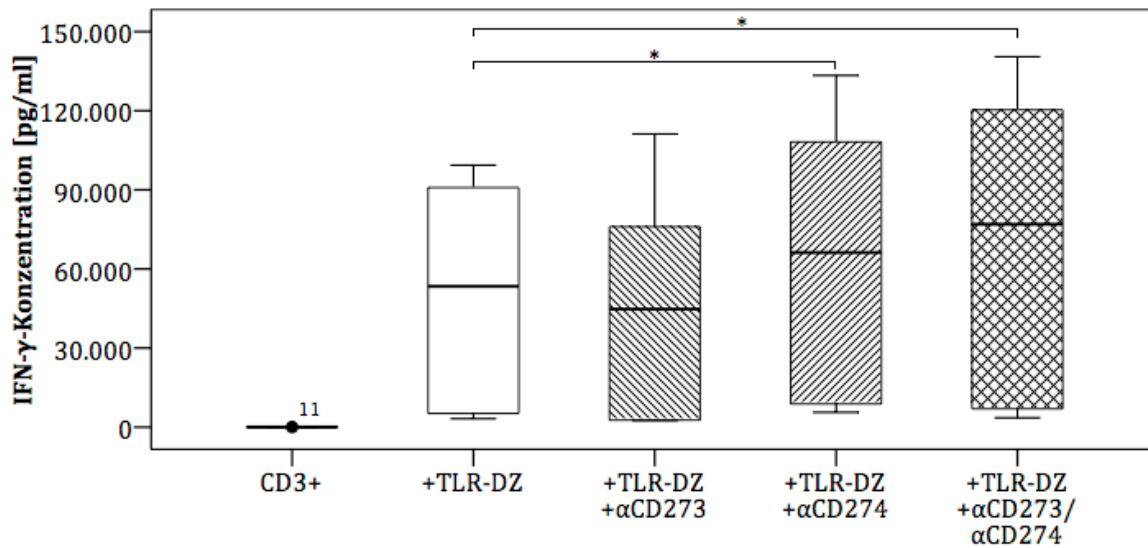


Abb. 4.8. Einfluss der CD273- und CD274-Blockade auf die T_H1 -Polarisierung durch TLR-DZ
 CD3⁺ Zellen von 6 gesunden Spendern wurden zusammen mit autologen TLR-DZ für 4 Tage inkubiert, einmal ohne und einmal mit blockierenden Antikörpern gegen CD273 und CD274. Als Negativkontrolle diente eine reine T-Zell-Kultur. Die Überstände wurden mittels ELISA auf ihre IFN- γ -Konzentration untersucht. *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$.

Auch cc-DZ führten in Abwesenheit von blockierenden Antikörpern zu einer hohen IFN- γ -Produktion durch die T-Zellen (Mittelwert=6915 pg/ml; $n=6$) gegenüber der Negativkontrolle (Mittelwert=37; $n=11$; $p=0,016$). Eine Blockade von CD274 erhöhte auch hier signifikant die IFN- γ -Produktion (Mittelwert=13273 pg/ml; $n=6$; $p=0,016$). Keinen Einfluss auf die IFN- γ -Produktion hatte die Blockade von CD273 (Mittelwert=6666; $n=6$). Die Kombination beider Antikörper (anti-CD273 und anti-CD274) führte ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der IFN- γ -Konzentration (Mittelwert= 10296 pg/ml; $n=6$; $p=0,047$). Im Vergleich zur alleinigen CD274-Blockade bestand jedoch kein relevanter Unterschied (Abb. 4.9). Die Blockaden von CD275 (Mittelwert= 4428 pg/ml, $n=2$) und CD276 (Mittelwert= 5108 pg/ml, $n=2$) zeigten keine Veränderung der IFN- γ -Konzentration. Die Kombination aller vier Antikörper (Mittelwert= 10960 pg/ml; $n=2$) führte wiederum zu einer deutlichen Erhöhung der IFN- γ -Produktion. Allerdings ist dieser Unterschied aufgrund der niedrigen Fallzahl nicht signifikant.

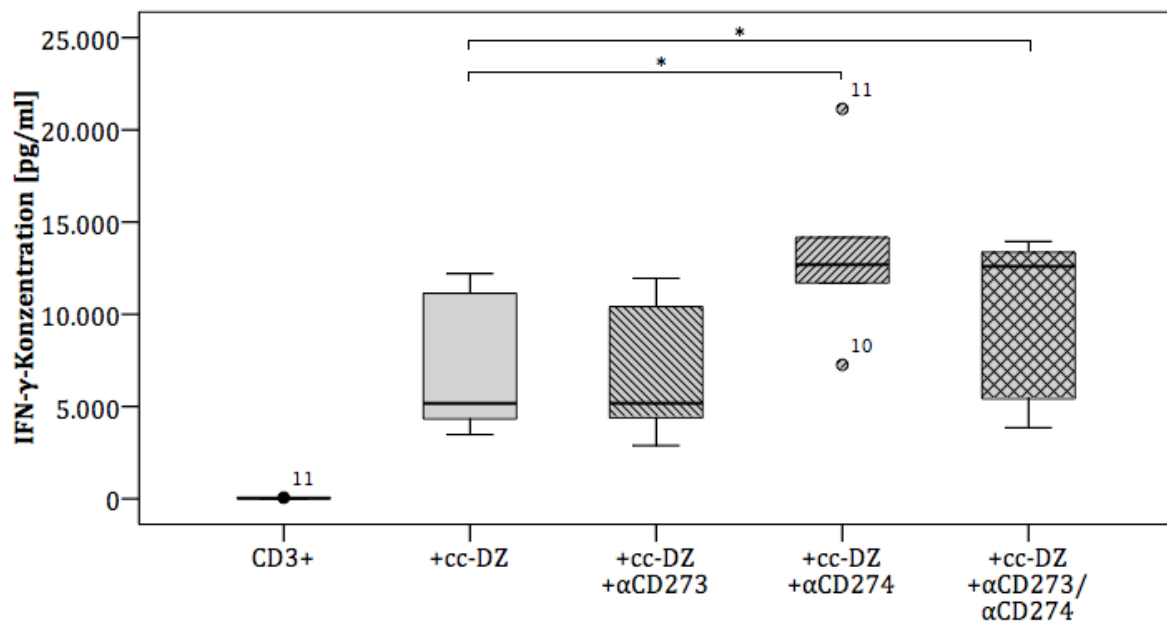


Abb. 4.9. Einfluss der CD273- und CD274-Blockade auf die T_H1-Polarisierung durch cc-DZ

CD3⁺ Zellen von 6 gesunden Spendern wurden zusammen mit autologen cc-DZ für 4 Tage inkubiert, einmal ohne und einmal mit blockierenden Antikörpern gegen CD273 und CD274. Als Negativkontrolle diente eine reine T-Zell-Kultur. Die Überstände wurden mittels ELISA auf ihre IFN- γ -Konzentration untersucht. *, p<0,05, **, p<0,01.

IL-10-DZ führten bei elf Spendern zu einer leichten Erhöhung der IFN- γ -Produktion durch die T-Zellen (Mittelwert=142,86 pg/ml) gegenüber der Negativkontrolle (Mittelwert=37; p=0,042). Bei diesen Spendern führte eine Blockade von CD274 zu einem signifikanten Anstieg der IFN- γ -Produktion (Mittelwert=508 pg/ml; p=0,002), eine Blockade von CD273 hingegen hatte keinen Einfluss auf die T_H1-Polarisierung durch IL-10-DZ (Mittelwert=182 pg/ml). Die Kombination der beiden Antikörper gegen CD273 und CD274 führte bei sieben Spendern ebenfalls zu einer erhöhten IFN- γ -Produktion (Mittelwert=576 pg/ml; p=0,016). Im Vergleich zur alleinigen CD274-Blockade war die IFN- γ -Konzentration signifikant höher (p=0,023).

Bei sieben Spendern zeigten sowohl die Blockade von CD275 (Mittelwert= 155 pg/ml; n=7) als auch die Blockade von CD276 (Mittelwert= 254 pg/ml; n=7) keinen Einfluss auf die IFN- γ -Produktion. Die Kombination aller Antikörper gegen CD273, CD274, CD275 und CD276 führte wiederum zu einer signifikant höheren IFN- γ -Produktion (Mittelwert= 479 pg/ml; n=7; p=0,016; Abb. 4.10).

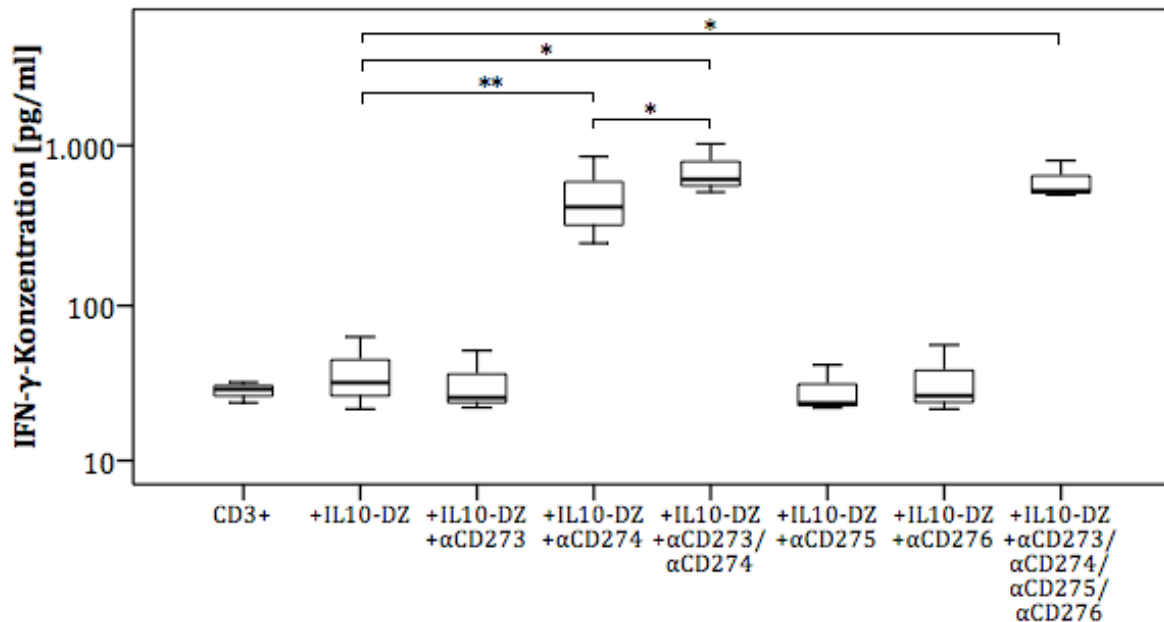


Abb. 4.10. Einfluss der Blockade von CD273, CD274, CD275 und CD276 auf die T_H1 -Polarisierung durch IL-10-DZ

CD3⁺ Zellen von 3 gesunden Spendern wurden zusammen mit autologen cc-DZ für 4 Tage inkubiert, einmal ohne und einmal mit blockierenden Antikörpern gegen CD273, CD274, CD275 und CD276. Als Negativkontrolle diente eine reine T-Zell-Kultur. Die Überstände wurden mittels ELISA auf ihre IFN- γ -Konzentration untersucht. *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$.

4.1.4 Einfluss von CTLA-4 auf die T_H1 -Polarisierung

Wenn eine T-Zelle aktiviert wird, reguliert sie nach einiger Zeit den Rezeptor CTLA-4 hoch. CTLA-4 bindet genau wie CD28 an CD80 und CD86 und vermittelt ein inhibitorisches Signal an die T-Zelle. Eine Blockade von CTLA-4 könnte somit zu einer längeren und stärkeren Immunantwort führen, da CD80 und CD86 weiterhin an CD28 binden würden.

Im Folgenden wurde untersucht, welche Auswirkungen eine CTLA-4-Blockade auf die T_H1 -Polarisierung durch TLR-, cc- und IL-10-DZ hat. Dafür wurde wie oben beschrieben eine autologe Kokultur von CD3⁺ Zellen und dem jeweiligen DZ-Typ (TLR-, cc- und IL-10-DZ) verwendet unter Hinzugabe eines humanen anti-CTLA-4-Antikörpers in einer Konzentration von 1,25 $\mu\text{g/ml}$. Die Auswertung erfolgte wieder über eine Analyse der Überstände mittels IFN- γ -ELISA.

Die CTLA-4-Blockade hatte in der Kokultur zwischen TLR-DZ und T-Zellen bei fünf Spendern einen signifikanten Anstieg der IFN- γ -Konzentration zur Folge

(Mittelwert=36950 pg/ml) im Vergleich zur reinen Kokultur von T-Zellen und TLR-DZ (Mittelwert=8141 pg/ml; $p=0,031$).

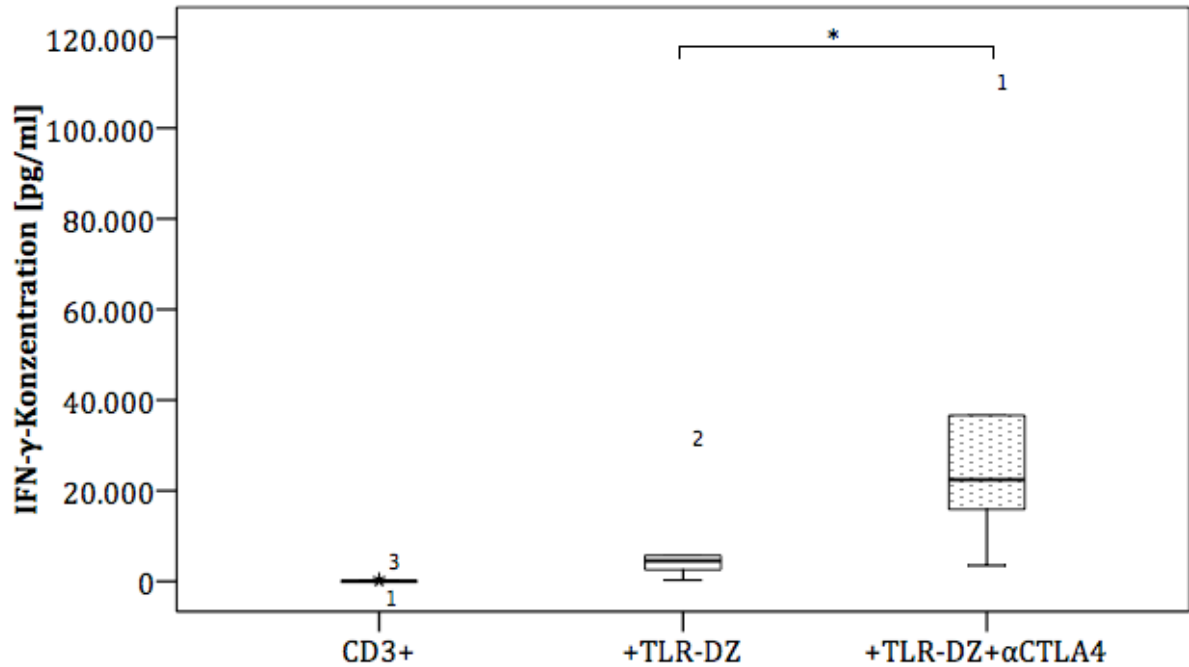


Abb. 4.11. IFN- γ -Produktion von T-Zellen nach Stimulation mit TLR-DZ mit und ohne CTLA-4-Blockade

CD3⁺ Zellen von 5 gesunden Spendern wurden zusammen mit autologen TLR-DZ für 4 Tage inkubiert, einmal ohne und einmal mit einem Antikörper gegen CTLA-4. Als Negativkontrolle diente eine reine T-Zell-Kultur. Die Überstände wurden mittels ELISA auf ihre IFN- γ -Konzentration untersucht. *, $p<0,05$, **, $p<0,01$.

Der Versuch wurde außerdem mit cc-DZ durchgeführt. Bei fünf Spendern führte eine Blockade von CTLA-4 zu einem deutlichen Anstieg der IFN- γ -Produktion (Mittelwert=8699 pg/ml) gegenüber der reinen Kokultur zwischen T-Zellen und cc-DZ (Mittelwert=1334 pg/ml; $p=0,031$, $n=5$).

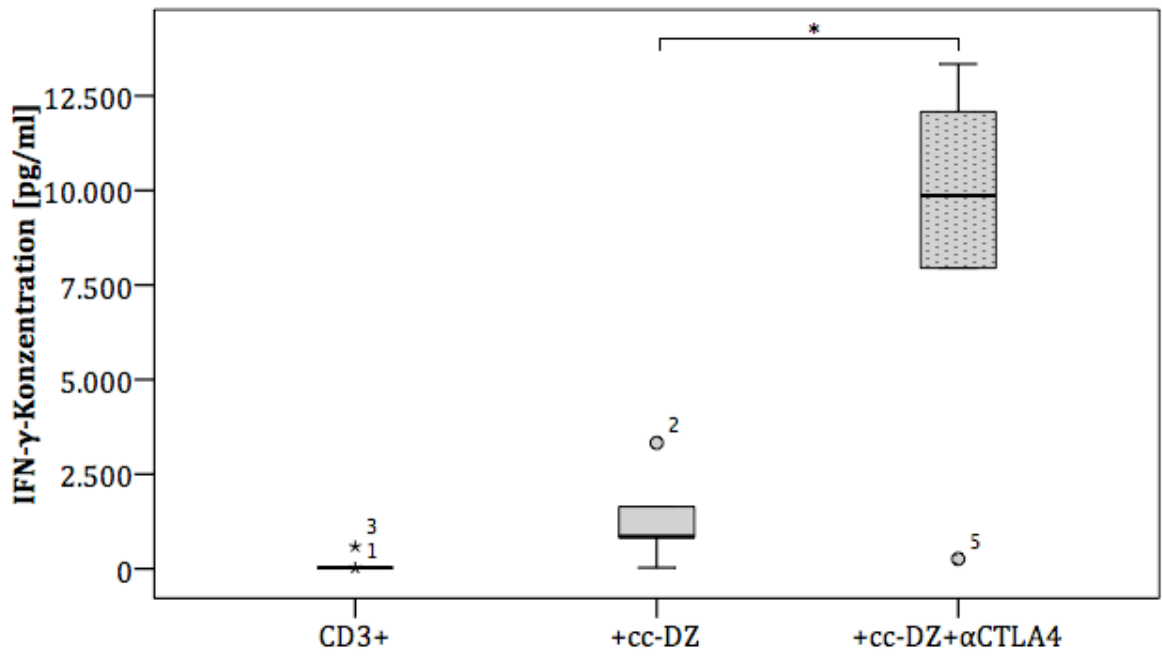


Abb. 4.12. IFN- γ -Produktion von T-Zellen nach Stimulation mit cc-DZ mit und ohne CTLA-4-Blockade

CD3⁺-Zellen von 5 gesunden Spendern wurden zusammen mit autologen cc-DZ für 4 Tage inkubiert, einmal ohne und einmal mit einem Antikörper gegen CTLA-4. Als Negativkontrolle diente eine reine T-Zell-Kultur. Die Überstände wurden mittels ELISA auf ihre IFN- γ -Konzentration untersucht. *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$.

Bei T-Zellen, die mit IL-10-DZ stimuliert wurden, hatte eine CTLA-4-Blockade bei fünf Spendern keinen Effekt auf die IFN- γ -Produktion (Mittelwert=47 pg/ml) im Vergleich zu fehlender CTLA-4-Blockade (Mittelwert=28 pg/ml).

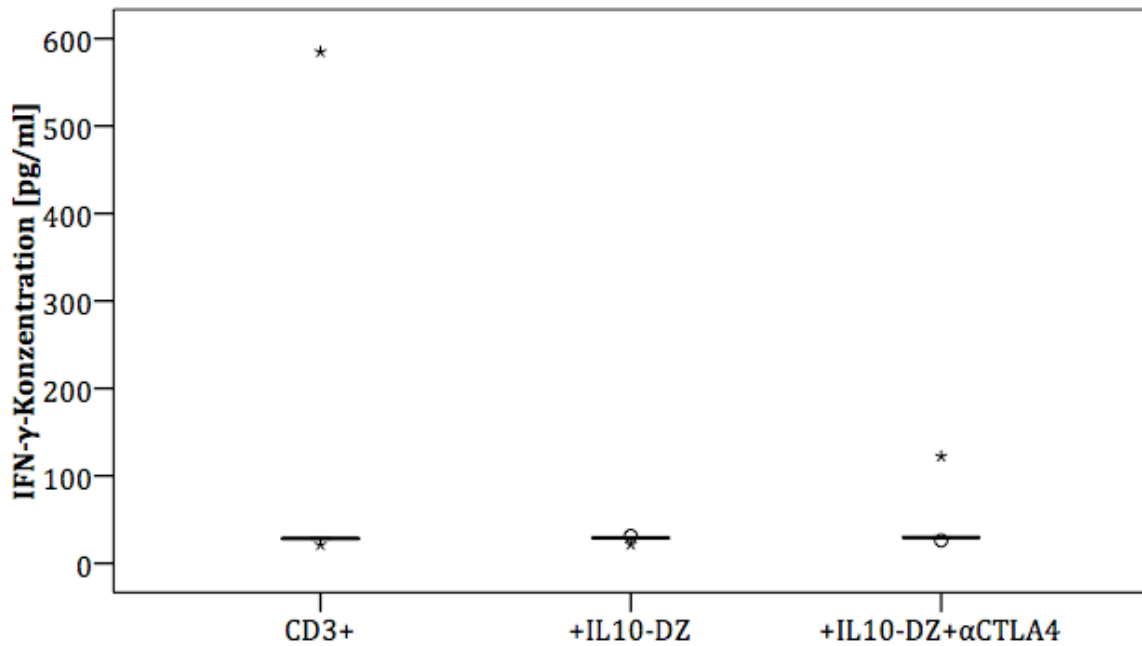


Abb. 4.13. IFN- γ -Produktion von T-Zellen nach Stimulation mit IL-10-DZ mit und ohne CTLA-4-Blockade

CD3⁺-Zellen von 5 gesunden Spendern wurden zusammen mit autologen IL-10-DZ für 4 Tage inkubiert, einmal ohne und einmal mit einem Antikörper gegen CTLA-4. Als Negativkontrolle diente eine reine T-Zell-Kultur. Die Überstände wurden mittels ELISA auf ihre IFN- γ -Konzentration untersucht. *, p<0,05, **, p<0,01.

4.2 Aktivierung von NK-Zellen durch dendritische Zellen

Zusätzlich zur T_H1-Polarisierung wurde die Fähigkeit der DZ eine NK-Zell-Aktivierung auszulösen untersucht. Da eine hohe IFN- γ -Produktion aktivierte NK-Zellen kennzeichnet, erfolgte die Auswertung mittels intrazellulärer IFN- γ -Färbung von CD3⁺/CD56⁺ Zellen sowie mittels IFN- γ -ELISA.

Sowohl in der intrazellulären IFN- γ -Färbung als auch im ELISA konnte gezeigt werden, dass TLR-DZ in der Lage sind NK-Zellen zu aktivieren. Im ELISA kam es bei acht Spendern zu einem signifikanten Anstieg der IFN- γ -Konzentration (Mittelwert=497 pg/ml) gegenüber der Negativkontrolle (Mittelwert=154 pg/ml; p=0,004). Auch in der intrazellulären Färbung stieg bei 13 Spendern der Anteil der IFN- γ ⁺ Zellen an (Mittelwert=2,36 %) im Vergleich zur Negativkontrolle (Mittelwert=1,58 %; p=0,047).

Bei den cc-DZ konnte keine NK-Zell-Aktivierung beobachtet werden. Die IFN- γ -Konzentration im ELISA stieg bei sechs Spendern nicht signifikant (Mittelwert=67

pg/ml) gegenüber der Negativkontrolle (Mittelwert=154 pg/ml; n=8) an. Auch der Anteil der IFN- γ ⁺ Zellen stieg bei neun Spendern nach Stimulation mit cc-DZ nicht an (Mittelwert= 0,98 %).

Die Ergebnisse für IL-10-DZ wurden nur durch die intrazelluläre IFN- γ -Färbung ausgewertet. Bei vier Spendern zeigte sich kein Anstieg der IFN- γ ⁺ Zellen (Mittelwert=1,12 %) gegenüber der Negativkontrolle (Mittelwert=1,58 %, n=13).

4.2.1 Einfluss von IL-12 auf die NK-Zell-Aktivierung

NK-Zellen werden über die Ausschüttung von IL-12 aktiviert. Im folgenden Versuch wurde die Rolle von IL-12 bei der NK-Aktivierung näher untersucht.

Auch hier wurde zu der 24-stündigen Kokultur aus den NAZ und der jeweiligen DZ-Sorte (TLR-, cc-, IL-10-DZ) ein humaner anti-IL12/IL-23p40/70-Antikörper in einer Konzentration von 10 μ g/ml hinzugegeben. Anschließend wurden die Überstände mittels IFN- γ -ELISA analysiert und eine intrazelluläre IFN- γ -Färbung durchgeführt.

Die Blockade von IL-12 bewirkte in der Kokultur zwischen T-Zellen und TLR-DZ ein nahezu vollständiges Aufheben der NK-Zell-Aktivierung. Die IFN- γ -Konzentration im ELISA war signifikant reduziert (Mittelwert=142 pg/ml, n=8) gegenüber der reinen Kokultur (Mittelwert=497 pg/ml, n=8, p=0,004; Abb. 4.14) und der Anteil der IFN- γ ⁺ Zellen in der intrazellulären Färbung war deutlich geringer (Mittelwert=0,63 %, n=13) verglichen mit der reinen Kokultur (Mittelwert=2,36 %, n=13, p=0,001; Abb. 4.15).

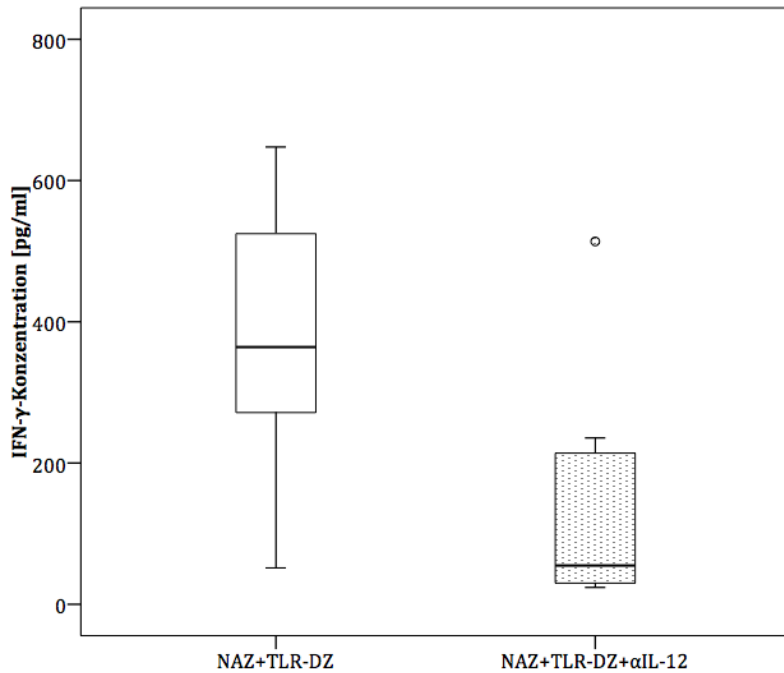


Abb. 4.14. NK-Zell-Aktivierung durch TLR-DZ vor und nach IL-12-Blockade

NAZ von 8 gesunden Spendern wurden 24 Stunden zusammen mit autologen TLR-DZ inkubiert und anschließend auf ihre IFN- γ -Produktion analysiert. Als Negativkontrolle dienten NAZ mit IL-2. Analyse der Überstände mittels IFN- γ -ELISA. $p=0,004$.

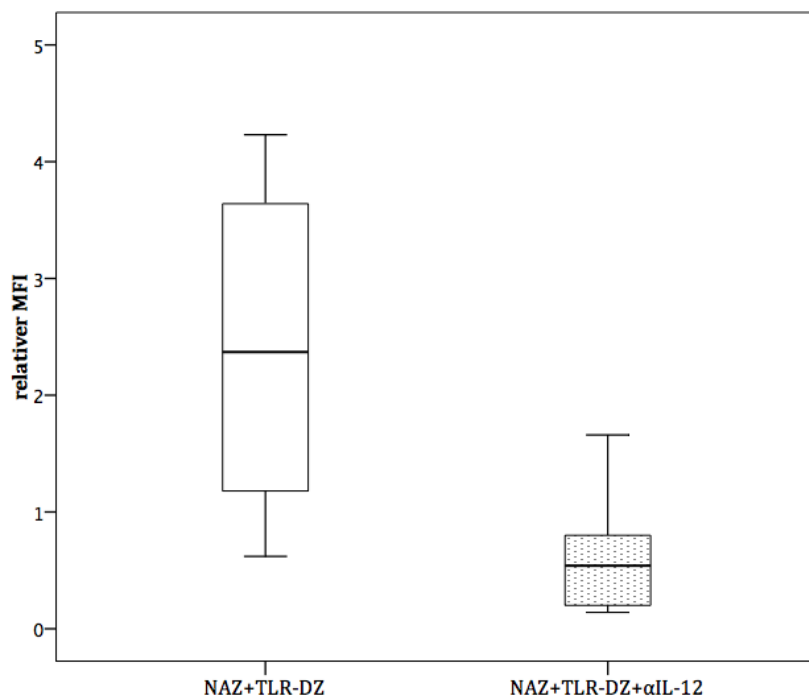


Abb. 4.15. NK-Zell-Aktivierung durch TLR-DZ vor und nach IL-12-Blockade

NAZ von 13 gesunden Spendern wurden 24h zusammen mit autologen TLR-DZ inkubiert und anschließend auf ihre IFN- γ -Produktion analysiert. Als Negativkontrolle dienten NAZ mit IL-2. Intrazelluläre IFN- γ -Färbung von CD3⁺/CD56⁺-Zellen. $p=0,001$.

Bei der NK-Zell-Aktivierung durch cc-DZ hatte die Blockade von IL-12 keinen Einfluss auf die IFN- γ -Konzentration. Sowohl ohne (Mittelwert=67 pg/ml) als auch mit Blockade (Mittelwert=50 pg/ml) kam es bei sechs Spendern zu keinem relevanten Anstieg der IFN- γ -Konzentration im ELISA. Auch in der intrazellulären Färbung veränderte sich bei neun Spendern der Anteil der IFN- γ^+ Zellen nicht relevant nach IL-12-Blockade (Mittelwert=0,73 %) gegenüber fehlender Blockade (Mittelwert=0,98 %).

Ebenso keinen Unterschied machte die IL-12-Blockade bei den IL-10-DZ. Der Anteil der IFN- γ^+ Zellen vor (Mittelwert=1,12 %) und nach IL-12-Blockade (Mittelwert=0,83 %) gab bei vier Spendern keinen Anhalt auf eine Aktivierung der NK-Zellen.

4.2.2 Einfluss von CD80 und CD86 auf die NK-Zell-Aktivierung

Anders als bei der T_H1-Polarisierung kam es nach IL-12-Blockade zu einem nahezu vollständigen Aufheben der NK-Zell-Aktivierung. Daraus lässt sich schließen, dass IL-12 den Hauptanteil bei der NK-Zell-Aktivierung ausmacht. Ob CD80 und CD86 als kostimulatorische Moleküle bei der NK-Zell-Aktivierung durch TLR-DZ mitwirken, wurde in einem weiteren Versuch analysiert.

Es wurde erneut eine Kokultur zwischen NAZ und TLR-DZ unter oben beschriebenen Bedingungen angelegt und zusätzlich wurden zu einigen Wells humane Antikörper gegen CD80 und CD86 in der Konzentration 10 μ g/ml hinzugefügt. Eine Auswertung erfolgte lediglich über die intrazelluläre IFN- γ -Färbung mit anschließender Analyse durch Durchflusszytometrie.

Eine Kombination aller blockierenden Antikörper gegen IL-12, CD80 und CD86 führte bei sieben Spendern zu einer signifikanten Reduktion der IFN- γ -Produktion ($p=0,008$). Weiterhin konnte bei drei Spendern gezeigt werden, dass eine Kombination von CD80/CD86-Blockade eine NK-Zell-Aktivierung nicht signifikant vermindert ($p=0,625$).

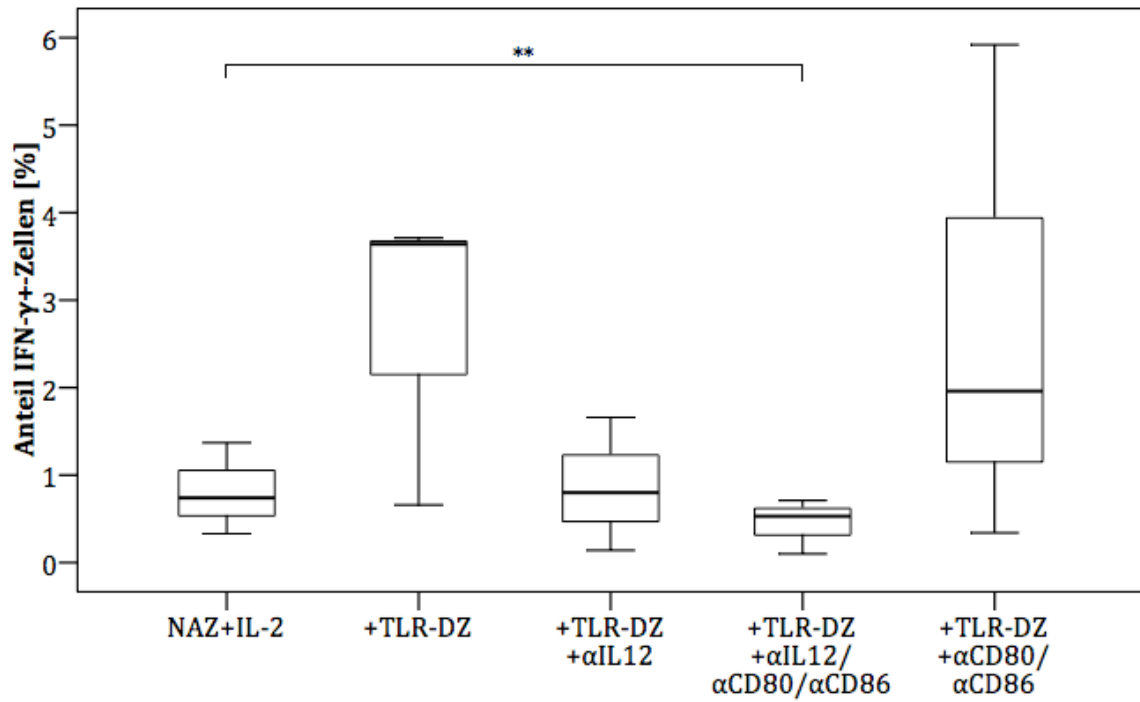


Abb. 4.16. NK-Zell-Aktivierung durch TLR-DZ vor und nach Blockade von IL-12 und CD80/CD86
 NAZ von 3 gesunden Spendern wurden 24 Stunden zusammen mit autologen TLR-DZ inkubiert und anschließend auf ihre IFN- γ -Produktion analysiert. Als Negativkontrolle dienten NAZ mit IL-2. Es erfolgte eine Intrazelluläre IFN- γ -Färbung von CD3⁺/CD56⁺-Zellen.

5 Diskussion

5.1 Bedeutung von IL-12 bei der NK-Zell-Aktivierung und T_H1-Polarisierung durch dendritische Zellen

Die wichtige proinflammatorische Wirkung von IL-12 ist bereits 1998 durch Trinchieri beschrieben worden (Trinchieri, 1998). Es wird von DZ produziert und wirkt auf NK-Zellen und naive T-Zellen. IL-12 führt zu einer Differenzierung von naiven T-Zellen zu T_H1-Zellen und damit zu einer vermehrten Produktion von IFN- γ (Moser & Murphy, 2000). Durch meine Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass TLR-DZ große Mengen an IL-12 produzieren. Außerdem wurde in autologen Kokulturen eine Aktivierung von NK-Zellen und T-Zellen in Richtung T_H1-Zellen durch die TLR-DZ nachgewiesen (Lichtenegger et al., 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von IL-12 auf die T_H1-Polarisierung und die NK-Zell-Aktivierung durch DZ näher untersucht. Dafür wurde die Wirkung von IL-12 gezielt durch einen blockierenden Antikörper in den autologen Kokulturen zwischen DZ und T- bzw. NK-Zellen aufgehoben. Da IFN- γ das charakteristische Zytokin für aktivierte NK-Zellen und T_H1-Zellen ist, wurde es als Maß der Zellaktivierung durch die DZ verwendet.

Die Ergebnisse konnten zeigen, dass eine IL-12-Blockade die T_H1-Polarisierung durch TLR-DZ und cc-DZ signifikant vermindert. Außerdem hat die IL-12-Blockade die Aktivierung von NK-Zellen durch DZ gehemmt. Es konnte somit bestätigt werden, dass IL-12 ein wesentlicher Faktor sowohl bei der T_H1-Polarisierung als auch bei der NK-Zell-Aktivierung darstellt. Der Effekt der IL-12-Blockade war in den Versuchen mit TLR-DZ deutlich ausgeprägter als in den Versuchen mit cc-DZ. Dies ist am ehesten durch die deutlich geringere IL-12-Produktion der cc-DZ zu erklären (Lichtenegger et al., 2012).

Schon Rissoan et al. konnten 1999 zeigen, dass nach Hinzugabe eines IL-12-neutralisierenden Antikörpers in eine Kokultur von DZ und T-Zellen zu einer Abnahme der IFN- γ -produzierenden Zellen führt. Ebenso wies diese Arbeitsgruppe nach Hinzugabe von IL-12 in die gleiche Kokultur eine Zunahme der INF- γ -produzierenden Zellen nach (Rissoan, et al., 1999). Für NK-Zellen konnte ähnliches 2005 durch Gerosa et al. gezeigt werden. In einer Kokultur von NK-Zellen und myeloiden DZ, die zuvor mit

poly-(I:C) stimuliert wurden, hatte eine IL-12 Blockade eine deutliche Reduktion der IFN- γ -Produktion zufolge (Gerosa et al., 2005).

Wenn man die Vordaten betrachtet, passen die Ergebnisse dieser Arbeit gut in das Gesamtbild. Interessant ist, dass es bei der T_H1-Polarisierung durch TLR-DZ nach IL-12-Blockade zwar zu einer deutlichen Reduktion der IFN- γ -Produktion jedoch nicht zu einer Aufhebung kam. Außerdem haben auch cc-DZ eine relativ starke T_H1-Polarisierung hervorgerufen, ohne große Mengen an IL-12 zu produzieren. Diese Ergebnisse implizieren, dass neben IL-12 auch andere durch DZ vermittelte Signale eine Rolle spielen, die bisher nicht bekannt sind.

Aufgrund dieser wichtigen Rolle sowohl bei der T_H1-Polarisierung als auch bei der NK-Zell-Aktivierung wird dem IL-12 ein hohes Potenzial in der Immuntherapie von Tumorerkrankungen zugesagt (Cheever, 2008)

Bereits 1993 konnten Brunda et al. bei Mäusen eine deutliche Hemmung des Tumorwachstums durch IL-12 demonstrieren. Erste klinische Studien am Menschen konnten jedoch nur eine begrenzte antitumorale Wirkung zeigen. Eine Phase-1-Studie mit intravenös appliziertem rekombinanten humanen IL-12 zeigte immerhin bei zwei Patienten mit fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom bzw. malignem Melanom ein Therapieansprechen im Sinne einer partiellen bzw. kompletten Remission. Bei vier Patienten konnte eine Stabilisierung der Erkrankung erreicht werden (Atkins et al., 1997). Die darauffolgende Phase-II-Studie musste aufgrund starker, nichttolerierbarer Toxizitäten abgebrochen werden (Leonard et al., 1997). Ein Grund dafür ist vor allem die unselektive Stimulierung des Immunsystems durch Applikation von IL-12.

Eine Möglichkeit, diese Toxizitäten zu umgehen, ergab sich unter anderem durch die Verwendung von IL-12-modifizierten DZ (Xu, 2014). Zum Beispiel konnte bei Patienten mit fortgeschrittenen gastrointestinalen Tumoren gezeigt werden, dass DZ, die vorher mit IL-12-kodierenden Adenoviren beladen wurden, deutlich sicherer und verträglicher waren als systemisch appliziertes IL-12 (Mazzolini et al., 2005). Allerdings blieben die antitumoralen Wirkungen deutlich hinter den Erwartungen zurück: In der erwähnten Studie konnte von 11 Patienten, die die volle Dosis erhielten, nur bei einem Patienten mit Pankreaskarzinom eine partielle Remission erreicht werden. Zwei Patienten erreichten eine Stabilisierung der Erkrankung.

Es sind in den letzten Jahren mehrere Phase-1-Studien durchgeführt worden, die gezeigt haben, dass die Behandlung mit DZ eine sichere Methode der Immuntherapie ist. Der Goldstandard der darin verwendeten DZ entspricht den cc-DZ, die als Vergleichsgruppe in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden (Jonuleit et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass die TLR-DZ den cc-DZ in ihrer IL-12-Produktion deutlich überlegen sind. Daher ist zu erwarten, dass Impfstoffe, die TLR-DZ verwenden, bessere Ergebnisse hinsichtlich der antitumoralen Wirkung zeigen werden. Eine erste Studie mit einem TLR-DZ-Vakzin zur Therapie der fortgeschrittenen AML ist aktuell in München abgeschlossen worden. Erste Daten wurden auf dem ASH 2016 präsentiert (Lichtenegger et al., 2016).

5.2 Bedeutung von CD80 und CD86 bei der T_H1-Polarisierung durch dendritische Zellen

Bei der Differenzierung von naiven T-Zellen zu T_H1-Zellen nach Aktivierung durch DZ scheinen neben IL-12 weitere Signale eine Rolle zu spielen. Betrachtet man die Phänotypen der TLR- und cc-DZ, fällt auf, dass sie beide eine starke Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 aufweisen.

Diese beiden Moleküle sind die wichtigsten bekannten kostimulatorischen Rezeptoren aus der B7-Familie, die über eine Bindung an CD28 zu einer T-Zell-Proliferation führen (Linsley, Brady, Grosmaire, Aruffo, Damle & Ledbetter, 1991). Es konnte bisher nicht eindeutig gezeigt werden, ob sie die Differenzierung von naiven T-Zellen in eine bestimmte Richtung dirigieren oder ein eher unspezifisches aktivierendes Signal darstellen.

In dieser Arbeit wurde daher die Bedeutung der beiden B7-Moleküle CD80/CD86 bei der T_H1-Polarisierung durch DZ untersucht. Der Versuchsaufbau war der gleiche wie bei der IL-12-Blockade, diesmal wurden jedoch blockierende Antikörper gegen CD80 oder CD86 bzw. deren Kombination eingesetzt.

Die Blockade von CD80 zeigte bei dieser Versuchsanordnung keinen Einfluss auf die IFN- γ -Produktion der T-Zellen nach Stimulation mit TLR- oder cc-DZ. Daraus lässt sich schließen, dass CD80 allein keine entscheidende Rolle bei der T_H1-Polarisierung durch DZ spielt.

Die Blockade von CD86 hingegen führte zu einer starken Reduktion der IFN- γ -Produktion der T-Zellen, sowohl nach Stimulation mit TLR-DZ als auch nach Stimulation

mit cc-DZ. Die Blockade beider Moleküle hatte im Gegensatz zu der alleinigen CD86-Blockade eine etwas stärkere Reduktion der IFN- γ -Produktion zur Folge als die alleinige CD86-Blockade, was einen möglichen synergistischen Effekt von CD80 und CD86 vermuten lässt. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant, daher kann anhand der vorliegenden Ergebnisse dazu keine eindeutige Aussage getroffen werden. Aus den Ergebnissen geht jedoch eindeutig hervor, dass neben IL-12 auch CD86 ein wichtiges Signal bei der T_H1-gerichteten T-Zell-Aktivierung darstellt.

Mit der Rolle von CD80 und CD86 bei der T_H1-Polarisierung durch DZ haben sich bisher nur wenige Arbeitsgruppen beschäftigt. Kuchroo et al. verwendeten 1995 ein *in vitro*-Modell mit T-Zellen einer MBP-(basisches Myeloprotein)-transgenen Maus. Eine CD80-Blockade führte dabei zu einer vermehrten IL-4-Sekretion, während eine CD86-Blockade eine vermehrte IFN- γ -Produktion bewirkte. Die Ergebnisse wurden anschließend in einem *in vivo*-Mausmodell für experimentelle autoimmune Enzephalitis (EAE) getestet. Die EAE wird durch autoreaktive T_H1-Zellen vermittelt. Eine Heilung dieser Erkrankung ist durch vermehrte Produktion von T_H2-Zellen gekennzeichnet. *In vivo* führte die Injektion eines CD80-Antikörpers zu einer reduzierten Inzidenz der EAE, wogegen die Injektion von CD86-Antikörpern zu einer Verstärkung der Krankheitsintensität führte. Beide Modelle legen die Schlussfolgerung nahe, dass CD80 die T_H1-Zell-Differenzierung beeinflusst und CD86 eine Rolle bei der T_H2-Zell-Differenzierung spielt.

Auch De Becker et al. haben 1998 die Funktion von CD80 und CD86 in BALB/c-Mäusen untersucht, indem KLH- (engl. *keyhole limpet hemocyanin*) aktivierte DZ zusammen mit blockierenden Antikörpern gegen CD80 und/oder CD86 injiziert wurden. Nach sechs Tagen extrahiert man Lymphknotenzellen und bestimmte deren Zytokinproduktion. Die Neutralisierung von CD80 führte zu einer vermehrten IL-4-Produktion während die CD86-Blockade die IL-4-Produktion reduzierte und zu einer erhöhten IFN- γ -Sekretion führte. Wie Kuchroo et al. kommt diese Studie zu dem Schluss, dass CD86 die T_H2-Differenzierung vermittelt.

Zu ähnlichen Ergebnissen kommt auch eine Analyse von Ranger et al. (Ranger, Das, Kuchroo & Glimcher, 1996). In einem *in vitro*-Modell mit ovalbuminspezifischen T-Zellen von $\alpha\beta$ -TCR-transgenen Mäusen und physiologischen antigenpräsentierenden

Zellen wurde gezielt CD80 und CD86 blockiert und das Zytokinprofil untersucht. Auch hier führte eine CD80-Blockade zu verstärkter IL-4- und Abnahme der IFN- γ -Produktion, während bei einer CD86-Blockade der gegenteilige Effekt beobachtet wurde.

Die Ergebnisse der erwähnten Untersuchungen aus den 90er Jahren konnten in den Versuchen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. In dieser Arbeit hatte eine CD80-Blockade keinen Einfluss auf die IFN- γ -Produktion, wohingegen eine CD86-Blockade diese signifikant reduzierte. Grund für diese abweichenden Ergebnisse könnten die unterschiedlichen Versuchsbedingungen sein. Alle drei Arbeiten haben an Mausmodellen getestet, wohingegen in dieser Arbeit humane Zellen verwendet wurden.

Es gibt eine Arbeit von Chen und Nabavi aus dem Jahr 1994, die ähnliche Ergebnisse aufweist. In einer Kokultur von B-Zellen und CD4⁺ T-Zellen aus der Milz von C57BL/6J-Mäusen wurden zunächst sowohl CD80 als auch CD86 blockiert. Anschließend wurde mittels PCR (engl. *polymerase chain reaction*) die Zytokin-Genexpression der CD4⁺ T-Zellen, unter anderem von IL-2, IL-4, IFN- γ , gemessen (Chen & Nabavi, 1994). Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der IL-2- und IFN- γ -Sekretion nach B7-Blockade, wogegen die IL-4-Sekretion nicht maßgeblich beeinflusst wurde. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass CD80 und/oder CD86 an der T_H1-Polarisierung beteiligt sind, allerdings wurden CD80 und CD86 nicht einzeln neutralisiert.

Auch die Beeinflussung des kostimulatorischen Signalwegs über CD80/CD86 hat in der Klinik therapeutische Anwendung gefunden. Abatacept beispielsweise ist ein Fusionsprotein aus IgG und der extrazellulären CTLA-4-Domäne. Es imitiert CD80/CD86 und bindet an CTLA-4 auf der T-Zelle. So wird eine T-Zell-Aktivierung verhindert und damit die Immunantwort gehemmt (Primentel-Quiroz et al., 2016). Zugelassen ist es bereits für die Behandlung der rheumatoiden Arthritis sowie der juvenilen idiopathischen Arthritis, weitere Indikationen werden aktuell in klinischen Studien geprüft. Auch bei der Immuntherapie von Tumorerkrankung werden Antikörper verwendet, die den Signalweg von CD80 und CD86 über CD28 beeinflussen. Verschiedene agonistische CD28-Antikörper wurden in Mausmodellen getestet (Lin & Hünig, 2003). 2006 wurde in einer Phase-1-Studie im Menschen der Antikörper TGN1412 geprüft (Mikami & Sakaguchi, 2014). Da es innerhalb von wenigen Stunden

nach Verabreichung des Antikörpers zu einer lebensbedrohlichen Zytokinausschüttung kam, wurde die weitere klinische Verwendung des Antikörpers zurückgenommen.

5.3 Bedeutung von CD80 und CD86 bei der NK-Zell-Aktivierung durch dendritische Zellen

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, ist die NK-Zell-Aktivierung durch DZ noch nicht vollständig charakterisiert worden. Bewiesen ist, dass IL-12 einen entscheidenden Einfluss auf die NK-Zell-Aktivierung hat. Gerosa et al. haben 2005 gezeigt, dass neben IL-12 auch der direkte Zellkontakt zwischen NK-Zellen und dendritischen Zellen für eine optimale NK-Zell-Aktivierung notwendig ist. Durch welche Rezeptoren dieser Effekt vermittelt wird, ist bisher nicht bekannt. Daher sollte in dieser Arbeit unter anderem analysiert werden, ob die beiden kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86 in die NK-Zell-Aktivierung eingreifen. Hinweise dafür ergeben sich aus zwei Arbeiten aus den 1990er Jahren. In der Arbeit von Chambers et al. konnte 1996 durch CD80-exprimierende Tumorzelllinien eine NK-Zell-Aktivierung in Mäusen hervorgerufen werden (Chambers et al., 1996). Martin-Fontecha et al. zeigten 1999 eine NK-Zell-Aktivierung durch CD86-exprimierende Tumorzelllinien. Die Signalübermittlung schien allerdings nicht wie bei der T-Zell-Aktivierung über CD28 zu laufen, sondern über unbekannte Rezeptoren, da die Versuche an CD28-Knockout Mäusen durchgeführt wurden.

In den Ergebnissen dieser Arbeit konnte kein Einfluss von CD80 oder CD86 auf die NK-Zell-Aktivierung durch sowohl TLR-DZ als auch cc-DZ nachgewiesen werden. Ob neben IL-12 noch andere Faktoren die NK-Zell-Aktivierung durch DZ beeinflussen, bleibt demnach offen.

5.4 Bedeutung von CD274 (PD-L1) als Bindungspartner von PD-1 bei der T_H1-Polarisierung durch dendritische Zellen

Neben CD80 und CD86 sind weitere Vertreter der B7-Korezeptoren (CD273, CD274, CD275 und CD276) in der Literatur beschrieben worden, die in die T-Zell-Aktivierung modulatorisch eingreifen. Auch ihre Funktion bei der T_H1-Polarisierung durch DZ wurde in dieser Arbeit mit dem gleichen Versuchsaufbau durch selektive Antikörperblockade untersucht.

Eine Blockade von CD274 führte sowohl bei den TLR-DZ als auch bei den cc-DZ und IL-10-DZ zu einer signifikanten Erhöhung der IFN- γ -Sekretion in der Kokultur zwischen T-Zellen und dendritischen Zellen. CD274 hat demnach einen hemmenden Einfluss auf die Differenzierung von naiven T-Zellen zu T_H1-Zellen und zählt damit zu den inhibitorischen Signalen. Vermittelt wird diese inhibitorische Wirkung über die Bindung an PD-1, welches ähnlich wie CTLA-4 nach Aktivierung der T-Zelle auf ihrer Oberfläche hochreguliert wird (Freeman et al., 2000).

Die Ergebnisse dieser Arbeit entsprechen mehreren Arbeiten, die sich auch mit der Rolle von CD274 beschäftigten. Freeman et al. konnten 2000 sowohl im Tiermodell als auch bei humanen T-Zellen eine Abnahme der IFN- γ -Konzentration nach Stimulation mit einem aktivierenden CD274-Antikörper beobachten.

Auch Selenko-Gebauer et al. beschrieben 2003 eine inhibitorische Funktion von CD274. Mit dem Mausantikörper DF272 wurde CD274 auf unreifen DZ blockiert und eine Zunahme der T-Zell-Stimulation und Aufhebung der T-Zell-Anergie beobachtet. Interessant war, dass dieser Effekt nur bei den unreifen DZ gesehen wurde. Reife DZ regulierten zwar CD274 hoch, eine CD274-Blockade hatte jedoch keinen Effekt auf die T-Zell-Aktivierung. Möglicherweise werden die inhibitorischen Signale durch die starken kostimulatorischen Signale auf der Zelloberfläche der reifen DZ überdeckt. Hingegen hat eine CD274-Blockade bei unreifen DZ ohne kostimulatorische Signale eine deutlich stärkere Wirkung (Selenko-Gebauer et al., 2003). Diese aufgestellte Hypothese wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützt. Denn auch hier zeigte sich bei den IL-10-DZ ein deutlich stärkerer Einfluss der CD274-Blockade auf die IFN- γ -Produktion als bei den reifen DZ (TLR- und cc-DZ).

2002 konnten Dong et al. eine vermehrte Expression von CD274 auf Tumorzellen nachweisen. Es wurde vermutet, dass Tumorzellen über eine vermehrte CD274-Expression T-Zellen inaktivieren und damit einer Elimination durch das Immunsystem entgehen. Auch Curiel et al. widmeten sich 2003 dieser Frage. Bei Ovarialkarzinom-Patienten wies man eine erhöhte CD274-Expression auf Tumorzellen und DZ aus der Tumorumgebung nach. Eine Blockade von CD274 mit einem monoklonalen Antikörper *in vitro* hatte eine signifikant niedrigere IL-10-Produktion sowie signifikant höhere IFN- γ -Produktion der aktivierten T-Zellen zur Folge (Curiel et al., 2003). Zu einem

ähnlichen Schluss kam eine weitere Arbeitsgruppe 2006, die nachweisen konnte, dass CD274 vermehrt auf Nierenzellkarzinomzellen exprimiert wird. Eine Blockade mit anti-PD-L1-Maus-Antikörpern hatte auch hier eine Zunahme der IFN- γ -produzierenden T-Zellen zur Folge (Blank et al., 2006). Diese Erkenntnisse erhöhten das Interesse für CD274-blockierende Antikörper als Immuntherapeutikum für die Behandlung von Tumorerkrankungen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit passen gut zu den in der Literatur beschriebenen Daten und zeigen, dass der Signalweg über „CD274 – PD-1“ ein wichtiger Angriffspunkt für blockierende Antikörper (sog. Checkpoint-Inhibitoren) ist. Insbesondere PD-1-Antagonisten haben sich als therapeutisch effektiv erwiesen. Nivolumab und Pembrolizumab sind zwei Antikörper, die bereits für mehrere Indikationen zugelassen sind. Neben der Indikation des metastasierten malignen Melanoms ist Nivolumab inzwischen zur Behandlung des Nierenzellkarzinoms, des metastasierten Urothelkarzinoms, des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms und des Hodgkin-Lymphoms zugelassen (U.S. Food and Drug Administration, 2017). Weitere Indikationen befinden sich zurzeit in der klinischen Prüfung.

Atezolizumab ist ein Beispiel für einen antagonistischen CD274-Antikörper und seit 2016 für die Behandlung des Urothelkarzinoms und des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms zugelassen (Bellmunt et al., 2016). Durch eine Therapie mit CD274-Antikörpern erhofft man sich eine Reduktion der systemischen inflammatorischen Nebenwirkungen, da CD274 – wie oben beschrieben – überwiegend auf Tumorzellen bzw. in der Umgebung des Tumors exprimiert wird (Philips & Atkins, 2014).

5.5 Bedeutung von CD273 (PD-L2) bei der T_H1-Polarisierung durch dendritische Zellen

In dieser Arbeit wurde auch die Rolle der Rezeptoren CD273, CD275 und CD276 bei der T_H1-Polarisierung durch DZ untersucht. Die Blockade von CD273, CD275 und CD276 hatte im Gegensatz zur CD274-Blockade bei allen drei untersuchten dendritischen Zelltypen keinen signifikanten Einfluss auf die IFN- γ -Produktion der T-Zellen. Ein Grund dafür könnte die schwache Expression der Moleküle auf der Oberfläche der dendritischen Zellen sein, die deutlich geringer ausfiel als die CD80-, CD86- und die CD274-Expression.

Betrachtet man die bisher in der Literatur beschriebene Funktion von CD273, findet man widersprüchliche Ergebnisse.

Identifiziert wurde CD273 durch Latchman, et al. 2001 als zweiter Ligand für PD-1 neben CD274. Die Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass T-Zellen, die zuvor mit anti-CD3 aktiviert wurden, in der Anwesenheit von CD273 weniger stark proliferieren. Der Effekt war vergleichbar mit CD274, sodass die Wirkung ebenfalls als immuninhibitorisch eingeschätzt wurde (Latchman et al., 2001). Auch die Arbeitsgruppe um Gordon J. Freeman konnte zeigen, dass eine Bindung von CD273 an PD-1 die T-Zell-Proliferation und IL-2-Produktion inhibiert (Carter et al., 2002).

Brown et al. haben ebenfalls die PD-L2-Blockade bei drei verschiedenen dendritischen Zelltypen untersucht: unreife DZ (iDZ), reife DZ (ähnlich wie die cc-DZ dieser Arbeit) und tolerogene IL-10-maturierte DZ (den IL-10-DZ entsprechend). Bei allen drei DZ-Typen führte eine Blockade von CD273 zu einer vermehrten T-Zell-Proliferation und zu einer erhöhten Zytokin-Produktion. Der Effekt war analog zu den von mir erhobenen Daten zur CD274-Blockade am stärksten ausgeprägt bei den nicht so stimulatorisch potenten dendritischen Zellen (iDZ und IL-10-DZ) (Brown et al., 2003).

Die zitierten Arbeiten lassen auf eine inhibitorische Wirkung von CD273 schließen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten diese Wirkung nicht bestätigen. Eine Blockade von CD273 hatte weder bei den IL-10-DZ noch bei den TLR- und cc-DZ Einfluss auf die IFN- γ -Produktion. Im Vergleich zu CD274 scheint es demnach nur eine untergeordnete regulatorische Rolle bei der T_H1-Polarisierung zu spielen. Dazu passt, dass die stimulatorische Wirkung einer CD274-Blockade durch CD273, welches ebenfalls an PD-1 bindet, offenbar nicht aufgehoben wird. Allerdings ist die Vergleichbarkeit der Untersuchungen nur bedingt gegeben, da verschiedene Antikörper verwendet wurden. Eine alternative Erklärung für die fehlende inhibitorische Wirkung von CD273 könnte sein, dass der verwendete Antikörper möglicherweise gar keine inhibitorische Wirkung am CD273-Rezeptor hat.

Auch wenn CD273 allein nach den Ergebnissen dieser Arbeit keinen signifikanten Einfluss auf die T_H1-Polarisierung zu haben schien, stellte sich die Frage, ob CD273 möglicherweise synergistisch mit CD274 wirkt, da beide Marker an denselben Rezeptor binden. Die Versuche konnten diese Vermutung jedoch nicht bestätigen. Analog zu den Ergebnissen der alleinigen CD274-Blockade kam es zu einer vermehrten IFN- γ -

Produktion. Ein signifikanter Unterschied zwischen der kombinierten und der alleinigen Blockade von CD274 zeigte sich aber nicht. Bereits 2003 haben Brown et al. sich mit der Frage der Synergie von CD273 und CD274 beschäftigt. Wie bereits oben beschrieben wurde in dieser Studie bei drei verschiedenen Typen von DZ die T-Zell-Proliferation und die Zytokinproduktion untersucht. Eine Kombination der Blockade von CD273 und CD274 hatte dort eine deutlich stärkere T-Zell-Stimulation zur Folge als die Blockade der einzelnen Moleküle. Eine synergistische Wirkung der beiden Moleküle wurde daher vermutet (Brown et al., 2003).

Lediglich eine Arbeitsgruppe hat abweichend von den bisher zitierten Arbeiten 2001 eine stimulatorische Wirkung von CD273 beobachtet. Dort führte eine Aktivierung von T-Zellen mit einem agonistischen CD273-Antikörper zu einer erhöhten IFN- γ -Produktion (Tseng et al., 2001). Diese Ergebnisse widersprechen nicht nur der vorhandenen Literatur sondern auch den Ergebnissen dieser Arbeit, wo die vermeintlich kostimulatorische Wirkung von CD273 nicht bestätigt werden konnte.

5.6 Bedeutung von CD275 bei der T_H1-Polarisierung durch dendritische Zellen

Ein weiteres regulatorisches Molekül ist CD275, oder auch ICOS-L (engl. *inducible costimulator ligand*), dessen Wirkung auf die T_H1-Polarisierung durch DZ ebenfalls untersucht wurde. Es wurde 1999 als Bindungspartner des auf der T-Zell-Oberfläche exprimierten Rezeptors ICOS identifiziert und als kostimulatorisches Signal beschrieben (Yoshinaga et al., 1999; Hutloff et al., 1999).

In den Ergebnissen dieser Arbeit konnte keine signifikante Beeinflussung der IFN- γ -Produktion nach CD275-Blockade gesehen werden. Dies galt sowohl für TLR-DZ, cc-DZ als auch für IL-10-DZ.

Kopf et al. haben 2000 ebenfalls den Effekt der ICOS-L-ICOS-Interaktion auf die CD4⁺ T-Zell-Differenzierung untersucht. In einem Mausmodell (BALB/c-Mäuse) konnte nach ICOS-Blockade eine Reduktion sowohl der T_H1- als auch der T_H2-Zytokine nachgewiesen werden. ICOS-L bzw. CD275 scheint daher eine eher unspezifische Rolle bei der T-Zell-Aktivierung zu spielen (Kopf et al., 2000). Eine bedeutende Rolle bei der T_H1-Polarisierung durch DZ konnte für CD275 weder in der vorliegenden Arbeit noch in vorangegangenen Untersuchungen nachgewiesen werden.

5.7 Bedeutung von CD276 bei der T_H1-Polarisierung durch dendritische Zellen

Die Rolle von CD276 bei der T-Zell-Aktivierung durch DZ ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Es wurden sowohl stimulatorische als auch inhibitorische Effekte beschrieben (Loos et al., 2010). Chapoval et al. haben 2001 erstmals CD276 als neues Mitglied der B7-Familie beschrieben. In derselben Arbeit wurden auch erste *in vitro*-Analysen publiziert, die einen stimulatorischen Effekt von B7-H3 bei der Aktivierung von sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen belegen. Die Hinzugabe von B7-H3-Ig zu CD3-stimulierten T-Zellen hatte eine signifikante Steigerung der IFN- γ -Produktion zufolge, wogegen eine Blockade von B7-H3 mit Oligonukleotiden die IFN- γ -Produktion inhibierte (Chapoval et al., 2001). Mehrere *in vivo*-Daten stützen die Hypothese der stimulatorischen Wirkung von B7-H3 (Loos et al., 2010).

Im Gegensatz dazu konnten sowohl *in vitro*- als auch *in vivo*-Analysen eine inhibitorische Wirkung von CD276 auf die T-Zell-Differenzierung zeigen. DZ von B7-H3-Knockout-Mäusen zeigten eine verbesserte T-Zell-Stimulationsfähigkeit. Im Hinblick auf die T-Zell-Differenzierung konnte gezeigt werden, dass B7-H3 defiziente Mäuse überwiegend Autoimmunerkrankungen entwickelten, die eine T_H1-Antwort benötigen. Daraus wurde geschlossen, dass CD276 in der T_H1-Differenzierung ein negatives regulatorisches Signal darstellt (Suh, Gajewska & Okada, 2003).

Berücksichtigt man die oben beschriebenen Analysen von Suh et al., hätte in diesem Setting eine CD276-Blockade zu einer Erhöhung der IFN- γ -Produktion der T-Zellen führen müssen. Dies konnte jedoch in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Ein Grund könnte die nur geringe Expression von CD276 auf der Oberfläche der DZ sein. Wegen dieser Tatsache und der niedrigen Fallzahl ergab sich keine Signifikanz.

5.8 Bedeutung von CTLA-4 bei der T_H1-Polarisierung durch dendritische Zellen

CTLA-4 ist ein inhibitorischer Rezeptor auf der Oberfläche von T-Zellen. Er bindet CD80 und CD86 mit einer deutlich höheren Affinität als CD28 und reguliert so die Immunantwort. Eine Expression von CTLA-4 verhindert somit eine stimulierende Immunantwort über CD28. Der Körper verhindert durch diesen Mechanismus eine unkontrollierte, überschießende Immunantwort (McCoy & Le Gros, 1999).

In dieser Arbeit wurde gezielt CTLA-4 mit einem Antikörper in einer autologen Kokultur zwischen T-Zellen und DZ blockiert. Es zeigte sich eine deutliche Zunahme der IFN- γ -

Sekretion der T-Zellen nach Blockade von CTLA-4. Dies bestätigt die in der Literatur beschriebene Wirkung von CTLA-4 als starkes inhibitorisches Signal und demonstriert sein Potenzial sowohl bei der Immuntherapie von Tumorerkrankungen als auch bei der Therapie von Autoimmunerkrankungen. Die Blockade von CTLA-4 mittels des monoklonalen Antikörpers Ipilimumab hat bisher vielversprechende Ergebnisse bei der Therapie von fortgeschrittenen malignen Melanomen gezeigt. Ipilimumab ist seit 2011 für die Therapie des malignen Melanoms zugelassen und damit der Vorreiter aus der Familie der Checkpoint-Inhibitoren (Ito, Kondo, Tada & Kitano, 2014). In der vorliegenden Arbeit führte die Blockade von CTLA-4 in einer Kokultur mit DZ und T-Zellen zu einer vermehrten IFN- γ -Produktion und damit zu einer stärkeren T_H1-vermittelten Immunantwort. CTLA-4 wird außerdem vermehrt auf T_{reg}-Zellen exprimiert, sodass eine CTLA-4-Blockade gleichzeitig auch die immunsuppressive Wirkung von T_{reg}-Zellen abschwächt (Ito et al., 2014). Diese beiden Wirkmechanismen machen CTLA-4 zu einem sehr potenten Angriffspunkt für Immuntherapeutika.

6 Zusammenfassung

Der menschliche Körper verfügt über verschiedene Mechanismen zur Elimination von malignen Zellen. Viele dieser Abläufe werden maßgeblich durch zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen vermittelt. Immuntherapie bei Tumorerkrankungen basiert auf der antigenspezifischen Aktivierung dieser Zellen. DZ haben sich über die Aktivierung von CD4⁺ T_H1-Zellen als effektive Aktivatoren einer antigenspezifischen Immunantwort herausgestellt. Sogenannte DZ-Vakzine werden bereits bei verschiedenen Tumorerkrankungen in klinischen Studien getestet mit mäßigem Erfolg. Der bisherige Goldstandard für die *in vitro*-Generierung der DZ entspricht den in dieser Arbeit verwendeten cc-DZ und wurde 1997 von Jonuleit et al. entwickelt. Diese DZ besitzen zwar eine starke Expression kostimulatorischer Marker, jedoch ist ihre IL-12-Produktion, die entscheidend für eine T_H1-Polarisierung ist, nur gering. Die von Spranger et al. entwickelte Methode der DZ-Generierung unter Hinzunahme von TLR-7/8-Agonisten konnte DZ hervorbringen, die über eine deutlich stärkere IL-12-Produktion verfügen, und damit eine stärkere T_H1-Antwort sowie NK-Zell-Aktivierung auslösen können. Welchen Anteil IL-12 und kostimulatorische Moleküle an der Induktion von T_H1-Zellen und NK-Zellen durch TLR-DZ haben ist aktuell nicht bekannt. Ziel der Arbeit war, die Bedeutung von IL-12 und der Korezeptoren der B7-Familie (CD80, CD86, CD273, CD274, CD275, CD276) zu ermitteln. In einem zweiten Schritt wurde geprüft, ob durch Blockade einzelner Rezeptoren eine Modulation der Immunantwort möglich ist. In autologen Kokulturen mit T-Zellen und NK-Zellen wurde durch spezifische Antikörperblockade der Einfluss der einzelnen Stimuli getestet. Die Auswertung erfolgte durch Messung der IFN- γ -Konzentration in den Kulturüberständen mittels ELISA oder Durchflusszytometrie. Es konnte gezeigt werden, dass die T_H1-Polarisierung durch die konventionellen und TLR-maturierten DZ sowohl durch IL-12 als auch durch das kostimulatorische Signal CD86 vermittelt wird. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass CD80 keine wesentliche Rolle bei der T_H1-Polarisierung durch DZ spielt. CD274 konnte bei allen drei DZ-Gruppen als koinhibitorisches Signal identifiziert werden, eine Blockade führte zu einer signifikanten Erhöhung der IFN- γ -Sekretion. Auch die Blockade von CTLA-4 bewirkte einen Anstieg der IFN- γ -Konzentration in der Kokultur als Zeichen einer inhibitorischen Wirkung. Beide Moleküle werden in der Klinik erfolgreich als sogenannte Checkpoint-Inhibitoren bei der Therapie einiger Malignome eingesetzt. Neben CD274 und CTLA-4 wurde in dieser

Arbeit der Einfluss von CD273, CD275 und CD276 auf die T_H1-Polarisierung durch DZ untersucht. Für alle drei Moleküle konnte kein stimulatorischer oder inhibitorischer Einfluss nachgewiesen werden. Für die NK-Zell-Aktivierung durch DZ konnte IL-12 als entscheidendes Signal identifiziert werden, während kostimulatorische Moleküle keinen Einfluss hatten.

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit die Überlegenheit der TLR-DZ bei der Stimulation einer T_H1-gerichteten Immunantwort gegenüber den bisher standardmäßig verwendeten cc-DZ. Ihre Wirkung entfalten TLR-DZ vor allem über die Sekretion von IL-12 sowie über die Expression von CD86. Bei CD274 und CTLA-4 handelt es sich um inhibitorische Signale. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Kombination der DZ-Vakzine mit blockierenden Antikörpern gegen CD274 oder CTLA-4 den immuntherapeutischen Effekt von TLR-DZ noch verbessern könnten.

7 Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K., Murphy, K. M. & Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383 (6603), 787-793.
- Adams, S. (2009). Toll-like receptor agonists in cancer therapy. *Immunotherapy*, 1 (6), 949-964.
- Atkins, M. B., Robertson, M. J., Gordon, M., Lotze, M. T., DeCoste, M., DuBois, J. S., Ritz, J., Sandler, A. B., Edington, H.D., Garzone, P. D., Mier, J. W., Canning, C. M., Battiato, L., Tahara, H. & Sherman, M. L. (1997). Phase I Evaluation of Intravenous Recombinant Human Interleukin 12 in Patients with Advanced Malignancies. *Clinical Cancer Research*, 3 (3), 409-417.
- Azuma, M., Ito, D., Yagita, H., Okumura, K., Phillips, J. H., Lanier, L. L. & Somoza, C. (1993). B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature*, 366 (6450), 76-79.
- Banchereau, J. & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392 (6673), 245-252.
- Barth, R. J., Mulé, J. J., Spiess, P. J. & Rosenberg, S. A. (1991). Interferon gamma and tumor necrosis factor have a role in tumor regressions mediated by murine CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 173 (3), 647-658.
- Beck, B., Dörfel, D., Lichtenegger, F. S., Geiger, C., Lindner, L., Merk, M., Schendel, D. J. & Subklewe, M. (2011). Effects of TLR agonists on maturation and function of 3-day dendritic cells from AML patients in complete remission. *Journal of Translational Medicine*, 9 (151), 1-14.
- Bellmunt, J., Powles, T. & Vogelzang, N. J. (2017). A review on the evolution of PD-1/PD-L1 immunotherapy for bladder cancer: The future ist now. *Cancer Treatment Reviews*, 54, 58-67.
- Berger, T. G. & Schultz, E. S. (2003). Dendritic cell-based immunotherapy. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 276, 163-197.
- Bhardwaj, N., Gnjjatic, S. & Sawhney, N. B. (2010). TLR Agonists: Are They Good Adjuvants? *Cancer Journal*, 16 (4), 382-391.
- Blank, C., Kubal, J., Voelkl, S., Wiendl, H., Becker, B., Walter, B., Majdic, O., Gajewski, T. F., Theobald, M., Andreesen, R. & Mackensen, A. (2006). Blockade of PD-L1 (B7-H1) augments human tumor specific T cell responses in vitro. *International Journal of Cancer*, 119 (2), 317-327.
- Bour-Jordan, H. & Bluestone, J. A. (2002). CD28 Function: A Balance of Costimulatory and Regulatory Signals. *Journal of Clinical Immunology*, 22 (1), 1-7.

- Brandt, C. S., Baratin, M., Yi, E. C., Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., Haldeman, B., Ostrander, C. D., Kaifu, T., Chabannon, C., Moretta, A., West, R., Xu, W., Vivier, E. & Levin, S. D. (2009). The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor Nkp30 in humans. *Journal of Experimental Medicine*, 206 (7), 1495-1503.
- Brown, J. A., Dorfman, D. M., Ma, F.-R., Sullivan, E. L., Munoz, O., Wood, C. R., Greenfield, E. A. & Freeman, G. J. (2003). Blockade of Programmed Death-1 Logans on Dendritic cells Enhances T Cell Activation and Cytokine Production. *Journal of Immunology*, 170 (3), 1257-1266.
- Brunda, M. J., Luistro, L., Warriar, R. R., Wright, R. B., Hubbard, B. R., Murphy, M., Wolf, S. F. & Gately, M. K. (1993). Antitumor and Antimetastatic Activity of Interleukin 12 against Murine Tumors. *Journal of Experimental Medicine*, 178 (4), 1223-1230.
- Carter, L. L., Fouser, L. A., Jussif, J., Fitz, L., Deng, B., Wood, C. R., Collins, M., Honjo, T., Freeman, G. J. & Carreno, B. M. (2002). PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4+ and CD8+ T cells and is overcome by IL-2. *European Journal of Immunology*, 32 (3), 634-643.
- Cella, M., Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. (1997). Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Current Opinions in Immunology*, 9 (1), 10-16.
- Chambers, B. J., Salcedo, M. & Ljunggren, H.-G. (1996). Triggering of Natural Killer Cells by the Costimulatory Molecule CD80 (B7-1). *Immunity*, 5 (4), 311-317.
- Chapoval, A. I., Ni, J., Lau, J. S., Wilcox, R. A., Flies, D. B., Liu, D., Dong, H., Sica, G. L., Zhu, G., Tamada, K. & Chen, L. (2001). B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN- γ production. *Nature Immunology*, 2 (3), 269-274.
- Chapuis, F., Rosenzweig, M., Yagello, M., Ekman, M., Biberfeld, P. & Gluckman, J. C. (1997). Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *European Journal of Immunology*, 27 (2), 431-441.
- Cheever, M. (2008). Twelve Immunotherapy drugs that could cure cancers. *Immunology Review*, 222, 357-368.
- Chen, C. & Nabavi, N. (1994). In Vitro Induction of T cell anergy by blocking B7 and Early T cell Costimulatory Molecule ETC-1/B7-2. *Cell Press*, 1 (2), 147-154.
- Chen, W. J. (2011). Tregs in immunotherapy: opportunities and challenges. *Immunotherapy*, 3 (8), 911-914.
- Cingoz, O. (2009). Ustekinumab. *mAbs*, 1 (3), 216-221.
- Coley, W. B. (1893). The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with report of ten original cases. *American Journal of the Medical Sciences*, 262, 3-11.

- Collins, M., Ling, V. & Carreno, B. M. (2005). The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biology*, 6 (6), 223.
- Curiel, T. J., Wei, S., Dong, H., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Krzysiek, R., Knutson, K. L., Daniel, B., Zimmermann, M. C., David, O., Burow, M., Gordon, A., Dhurandhar, N., Myers, L., Berggren, R., Hemminki, A., Alvarez, R. D., Emilie, D., Curiel, D. T., Chen, L. & Zou, W. (2003). Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nature Medicine*, 9 (5), 562-567.
- De Becker, G., Moulin, V., Tielemans, F., De Mattia, F., Urbain, J., Leo, O. & Moser, M. (1998). Regulation of T helper cell differentiation in vivo by soluble and membrane proteins provided by antigen-presenting cells. *European Journal of Immunology*, 28 (10), 3161-3171.
- Dieu, M. C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J. M., Oldham, E., Ait-Yahia, S., Brière, F., Zlotnik, A., Lebecque, S. & Caux, C. (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *Journal of Experimental Medicine*, 188 (2), 373-386.
- Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D. B., Roche, P. C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., Lennon, V. A., Celis, E. & Chen, L. (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nature Medicine*, 8 (8), 793-800.
- Felquer, M. & Soriano, E. (2015). New treatment paradigms in psoriatic arthritis: an update on new therapeutics approved by the U.S. Food and Drug Administration. *Current Opinion in Rheumatology*, 27 (2), 99-106.
- Fernandez, N. C., Lozier, A., Flament, C., Ricciardi-Castagnoli, P., Bellet, D., Suter, M., Perricaudet, M., Tursz, T., Maraskovsky, E. & Zitvogel, L. (1999). Dendritic cells directly trigger NK cell functions: Cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nature of Medicine*, 5 (4), 405-411.
- Freeman, G. J., Gray, G. S., Gimmi, C. D., Lombard, D. B., Zhou, L.-J., White, M., Fingerhuth, J. D., Gribben, J. G. & Nadler, L. M. (1991). Structure, Expression and T Cell Costimulatory Activity of the Murine Homologue of the B Lymphocyte Activation Antigen B7. *Journal of Experimental Medicine*, 174 (3), 625-631.
- Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., Horton, H. F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M. R., Carreno, B. M., Collins, M., Wood, C. R. & Honjo, T. (2000). Engagement of the PD-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to negative

- regulation of Lymphocyte Activation. *Journal of Experimental Medicine*, 192 (7), 1027-1034.
- Freudenthal, P. S. & Steinman, R. M. (1990). The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87 (19), 7698-7702.
- Gately, M. K., Renzetti, L. M., Magram, J., Stern, A. S., Adorini, L., Gubler, U. & Presky, D. H. (1998). The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annual Review of Immunology*, 16, 495-521.
- Gerosa, F., Gobbi, A., Zorzi, P., Burg, S., Briere, F., Carra, G. & Trinchieri, G. (2005). The Reciprocal Interaction of NK Cells with Plasmacytoid or Myeloid Dendritic Cells Profoundly Affects Innate Resistance Functions. *The Journal of Immunology*, 174 (2), 727-734.
- Hauser, M. A. & Legler, D. F. (2016). Common and biased signaling pathways of the chemokine receptor CCR7 elicited by its ligands CCL19 and CCL21 in leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, 99 (6), 869-882.
- Herberman, R. B. & Ortaldo, J. R. (1981). Natural Killer Cells: Their Role in Defenses Against Disease. *Science*, 214 (4516), 24-30.
- Hirahara, K. & Nakayama, T. (2016). CD4+ T cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm. *International Immunology*, 28 (4), 163-171.
- Hishii, M., Kurnick, J. T., Ramirez-Montagut, T. & Pandolfi, F. (1999). Studies of the mechanism of cytotoxicity by tumor-infiltrating lymphocytes. *Clinical and Experimental Immunology*, 116 (3), 388-394.
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda K. & Akira S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4) deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the LPS gene product. *Journal of Immunology*, 162 (7), 3749-3752.
- Hoyer, S., Prommersberger, S., Pfeiffer, I. A., Schuler-Thurner, B., Schuler, G., Dörrie, J. & Schaft, N. (2014). Concurrent interaction of DCs with CD4(+) and CD8(+) T cells improves secondary CTL expansion: I takes three to tango. *European Journal of Immunology*, 44 (12), 3543-3559.
- Hutloff, A., Dittrich, A. M., Beier, K. C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I. & Kroczek, R. A. (1999). ICOS is an inducible T cell costimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*, 397 (6716), 263-266.

- Ito, A., Kondo, S., Tada, K. & Kitano, S. (2015). Clinical Development of Immune Checkpoint Inhibitors. *BioMed Research International*, Epub 2015 Jun 16.
- Jacobs, B., Wuttke, M., Papewalis, C., Seissler, J. & Schott, M. (2008). Dendritic cell subtypes and in vitro generation of dendritic cells. *Hormone and Metabolic Research*, 40 (2), 99-107.
- Jin, B., Sun, T., Yu, X.-H., Yang, Y.-X. & Yeo, A. E. (2012). The Effects of TLR Activation on T-Cell Development and Differentiation. *Clinical and Developmental Immunology*, Epub 2012 Jun 7.
- Jonuleit, H., Kühn, U., Müller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J. & Enk, A. H. (1997). Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *European Journal of Immunology*, 27 (12), 3135-3142.
- Jonuleit, H., Giesecke-Tuettenberg, A., Tüting, T., Thurner-Schuler, B., Stuge, T. B., Paragnik, L., Kandemir, A., Lee, P. P., Schuler, G., Knop, J. & Enk, A. H. (2001). A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melonam-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. *International Journal of Cancer*, 93 (2), 243-251.
- Kalinski, P., Hilkens, C. M., Wierenga, E. A. & Kapsenberg, M. L. (1999). T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunology Today*, 20 (12), 561-567.
- Kalinski, P., Giermasz, A., Nakamura, Y., Basse, P., Storkus, W. J., Kirkwood, J. M. & Mailliard, R. B. (2005). Helper role of NK cells during the induction of anticancer responses by dendritic cells. *Molecular Immunology*, 42 (4), 535-539.
- Kavanaugh, A. (2014). Ustekinumab, an anti-IL-12/23 p40 monoclonal antibody, inhibits radiographic progression in patients with active psoriatic arthritis: results of an integrated analysis of radiographic data from the phase 3, multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled PSUMMIT-1 and PSUMMIT-2 trials. *Annals of the Rheumatologic Diseases*, 73 (6), 1000-1006.
- Kopf, M., Coyle, A. J., Schmitz, N., Barner, M., Oxenius, A., Gallimore, A., Gutierrez-Ramos, J. C. & Bachmann, M. F. (2000). Inducible Costimulator Protein (ICOS) Controls T Helper Cell Subset Polarization after Virus and Paracite Infection. *Journal of Experimental Medicine*, 192 (1), 53-61.
- Kuchroo, V. K., Das, M. P., Brown, J. A., Ranger, A. M., Zamvil, S. S., Sobel, R. A., Weiner, H. L., Nabavi, N. & Glimcher, L. H. (1995). B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate

differentially the Th1/Th2 developmental pathways: Application to autoimmune disease therapy. *Cell Press*, 80 (5), 707-718.

- Kumar, R., Collins, D., Dolly, S., McDonald, F., O'Brien, M. E. & Yap, T. A. (2016). Targeting des PD-1/PD-L1 axis in non-small cell lung cancer. *Current Problems in Cancer*, 41 (2), 111-124.
- Latchman, Y., Wood, C. R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A. J., Brown, J. A., Nunes, R., Greenfield, E. A., Bourque, K., Boussiotis, V. A., Carter, L. L., Carreno, B. M., Malenkovich, N., Nishimura, H., Okazaki, T., Honjo, T., Sharpe, A. H. & Freeman, G. J. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Medicine*, 2 (3), 261-268.
- Leonard, J. P., Sherman, M. L., Fisher, G. L., Buchanan, L. J., Larsen, G., Atkins, M. B., Sosman, J. A., Dutcher, J. P., Vogelzang, N. J. & Ryan, J. L. (1997). Effects of Single-dose Interleukin-IL12 Exposure on Interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production. *Blood Journal*, 90 (7), 2541-2548.
- Leonardi, C. L., Kimball, A. B., Yeilding, N., Guzzo, C., Wang, Y., Li, S., Dooley, L. T., Gordon, K. B. & PHOENIX 1 study investigators (2008). Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 76-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 1). *Lancet*, 371 (9625), 1665-1674.
- Leung, J. & Suhl, W.-K. (2014). The CD28-B7 Family in Anti-tumor Immunity: Emerging Concepts in Cancer Immunotherapy. *Immune Network*, 14 (6), 265-276.
- Lichtenegger, F., Müller, K., Otte, B., Beck, B., Hiddemann, W., Schendel, D. J. & Subklewe, M. (2012). CD86 and IL-12p70 Are Key Players for T Helper 1 Polarization and Natural Killer Cell Activation by Toll-like Receptor-induced Dendritic cells. *PLOS ONE*, 7 (9), Epub 2012 Sep 4.
- Lichtenegger, F. S., Deiser, K., Rothe, M., Schnorfeil, F. M., Krupka, C., Augsberger, C., Köhnke, T., Büclein, V. L., Altmann, T., Moosmann, A., Brüggemann, M., Heemskerk, M. H. M., Wittmann, G., Wagner, B., Hiddemann, W., Bigalke, I., Kvalheim, G. & Subklewe, M. (2016). Active Immunotherapy of Patients With Acute Myeloid Leukemia Using Autologous Dendritic Cells Transfected With RNA Encoding Leukemia-associated Antigens. *ASH 58th Annual Meeting & Exposition, San Diego, Ca December 3-6, 2016*. Verfügbar unter <https://ash.confex.com/ash/2016/webprogram/Paper92788.html> [29.03.2017]

- Lin, C. H. & Hünig, T. (2003). Efficient expansion of regulatory T cells in vitro and in vivo with CD28 superagonist. *European Journal of Immunology*, 33 (3), 626-638.
- Lindstein, T., June, C. H., Ledbetter, J. A., Stella, G. & Thompson, C. B. (1989). Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science*, 244 (4902), 339-343.
- Linsley, P. S., Brady, W., Grosmaire, L., Aruffo, A., Damle, N. K. & Ledbetter, J. A. (1991). Binding of the B Cell Activation Antigen B7 to CD28 Costimulates T Cell Proliferations and Interleukin 2 mRNA Accumulation. *Journal of Experimental Medicine*, 173 (3), 721-730.
- Lion, E., Smits, E. L., Berneman, Z. N. & Van Tendeloo, V. F. (2012). NK Cells: Key to success of DC-Based Cancer Vaccines? *The Oncologist*, 17 (10), 1256-1270.
- Loos, M., Hedderich, D. M., Friess, H. & Kleeff, J. (2010). B7-H3 and Its Role in Antitumor Immunity. *Clinical and Developmental Immunology*, Epub 2010 Nov 28.
- Luttmann, K., Bratke, K., Küpper, M. & Myrtek, D. (2009). *Der Experimentator: Immunologie* (3. Ausg.). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Lutzky, J. (2014). Checkpoint inhibitors in the treatment of cutaneous malignant melanoma. *Chinese Clinical Oncology*, 3 (3), 30.
- Mäkela, S. M., Strengell, M., Pietilä, T. E., Österlund, P. & Julkunen, I. (2009). Multiple signaling pathways contribute to synergistic TLR ligand-dependent cytokine gene expression in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 85 (4), S. 664-672.
- Martin-Fontecha, A., Assarsson, E., Carbone, E., Kärre, K. & Ljunggren, H.-G. (1999). Triggering of Murine NK Cells by CD40 and CD86 (B7-2). *The Journal of Immunology*, 162 (10), 5910-5916.
- Mazzolini, G., Alfaro, C., Sangro, B., Feijó, E., Ruiz, J., Benito, A., Tirapu, I., Arina, A., Sola, J., Heraiz, M., Lucena, F., Olagüe, C., Subtil, J., Quiroga, J., Herrero, I., Sádaba, B., Bendandi, M., Qian, C., Pisto, J. & Melero, I. (2005). Intratumoral Injection of Dendritic Cells Engineered to Secrete Interleukin-12 by Recombinant Adenovirus in Patients With Metastatic Gastrointestinal Carcinomas. *Journal of Clinical Oncology*, 23 (5), 999-1010.
- McCoy, K. D. & Le Gros, G. (1999). The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. *Immunology and Cell Biology*, 77 (1), 1-10.
- Mentlik, J. A., Cohen, A. D. & Campbell, K. S. (2013). Combination immune therapies to enhance anti-tumor responses by NK cells. *Frontiers in Immunology*, 4 (481), 1-12.
- Mikami, N. & Sakaguchi, S. (2014). CD28 signals the differential control of regulatory T cells and effector T cells. *European Journal of Immunology*, 44 (4), 955-957.

- Moser, M. & Murphy, K. M. (2000). Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nature*, 1 (3), 199-205.
- Mosmann, T. R. & Coffman, R. L. (1989). TH1 AND TH2 CELLS: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Annual Review of Immunology*, 7, 145-173.
- Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. (2008). *Janeway's Immunobiology*. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
- Napolitani, G., Rinaldi, A., Bertoni, F., Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. (2005). Selected TLR agonist combinations synergistically trigger a TH1 polarizing program in dendritic cells. *Nature Immunology*, 6 (8), 769-776.
- Osada, T., Clay, T., Hobeika, A., Lyerly, H. K. & Morse, M. A. (2006). NK cell activation by dendritic cell vaccine: a mechanism of action for clinical activity. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 55 (9), 1122-1131.
- Palucka, K. A., Taquet, N., Sanchez-Chapuis, F. & Gluckman, J. C. (1998). Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *Journal of Immunology*, 160 (9), 4587-4595.
- Palucka, K. & Banchereau, J. (2012). Cancer Immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews Cancer*, 12 (4), 265-277.
- Papp, K., Langley, R. G., Lebwohl, M., Krueger, G. G., Szapary, P., Yeilding, N., Guzzo, C., Hsu, M. C., Wang, Y., Li, S., Dooley, L. T., Reich, K. & PHOENIX 2 study investigators (2008). Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 52-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 2). *Lancet*, 371 (9625), 1675-1684.
- Pardoll, D. M. & Topalian, S. L. (1998). The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Current Opinion in Immunology*, 10 (5), 588-594.
- Philips, G. K. & Atkins, M. (2015). Therapeutic uses of anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies. *International Immunology*, 27 (1), 39-46.
- Primentel-Quiroz, V. R., Alarcón, G. S. & Ugarte-Gil, M. F. (2016). Abatacept for the Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. *Expert Opinions on Investigational Drugs*, 25 (4), 493-499.
- Qin, Z., Schwartzkopff, J., Pradera, F., Kammertoens, T., Seliger, B., Pircher, H. & Blankenstein, T. (2003). A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells. *Cancer Research*, 63 (14), 4095-4100.
- Ramos, C. A., Heslop, H. E. & Brenner, M. K. (2016). CAR-T Cell Therapy for Lymphoma. *Annual Review of Medicine*, 67, 165-183.

- Ranger, A. M., Das, M. P., Kuchroo, V. K. & Glimcher, L. H. (1996). B7-2 (CD86) is essential for the development of IL-4-producing T cells. *International Immunology*, 8 (10), 1549-1560.
- Rissoan, M.-C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal Malefyt, R. & Liu, Y.-J. (1999). Reciprocal Control of T Helper Cell and Dendritic Cell Differentiation. *Science*, 283 (5405), 1183-1186.
- Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A. & Bazan, J. F. (1998). A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95 (2), 588-593.
- Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T. & Nomura, T. (2006). Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunological Reviews*, 212, 8-27.
- Sandbourn, W. J., Gasink, C., Gao, L.-L., Blank, M. A., Johanns, J., Guzzo, C., Sands, B. E., Hanauer, S. B., Targan, S., Rutgeerts, P., Ghosh, S., de Villiers, W. J. S., Panaccione, R., Greenberg, G., Schreiber, S., Lichtiger, S. & Feagan, B. G. (2012). Ustekinumab induction and maintenance therapy in refractory Crohn's disease. *New England Journal of Medicine*, 367 (16), 1519-1528.
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T. & Hume, D. A. (2004). Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*, 75 (2), 163-189.
- Schuler-Thurner, B., Schultz, E. S., Berger, T., Weinlich, G., Ebner, S., Woerl, P., Bender, A., Feuerstein, B., Fritsch, P. O., Romani, N. & Schuler, G. (2002). Rapid induction of tumor specific type 1 helper T cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 195 (10), 1279-1288.
- Schütt, C. & Bröker, B. (2011). *Grundwissen Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Schwartz, R. H. (1992). Costimulation of T lymphocytes: The role of CD28, CTLA4 and B7/BB1 in Interleukin-2 Production and Immunotherapy. *Cell Press*, 71 (7), 1065-1068.
- Selenko-Gebauer, N., Majdic, O., Szekeres, A., Höfler, G., Guthann, E., Korthäuer, U., Zlabinger, G., Steinberger, P., Pickl, W. F., Stockinger, H., Knapp, W. & Stöckl, J. (2003). B7-H1 (Programmed Death-1 Ligand) on Dendritic cells Is Involved in the Induction and Maintenance of T Cell Anergy. *The Journal of Immunology*, 170 (7), 3637-3644.
- Sharon, E., Streicher, H., Goncalves, P. & Chen, H. X. (2014). Immune checkpoint Inhibitors in clinical trials. *Chinese Journal of Cancer*, 33 (9), 434-444.
- Sharpe, A. H. (2009). Mechanisms of Costimulation. *Immunological Reviews*, 229 (1), S. 5-11.

- Sica, G. L., Choi, I.-H., Zhu, G., Tamada, K., Wang, S.-D., Tamura, H., Chapoval, A. I., Flies, D. B., Bajorath, J. & Chen, L. (2003). B7-H4, a Molecule of the B7 Family, Negatively regulates T Cell Immunity. *Cell Press*, 18 (6), 849-861.
- Spranger, S., Javorovic, M., Bürdek, M., Wilde, S., Mosetter, B., Tippmer, S., Bigalke, I., Geiger, C., Schendel, D. J. & Frankenberger, B. (2010). Generation of Th1-Polarizing Dendritic Cells Using the TLR7/8 Agonist CL075. *Journal of Immunology*, 185 (1), 738-747.
- Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel Cell Type in Peripheral Lymphoid Organs of Mice. I. Morphology, Quantitation, Tissue distribution. *Journal of Experimental Medicine*, 137 (5), 1142-1162.
- Steinman, R. M. & Banchereau, J. (2007). Taking dendritic cells into medicine. *Nature*, 449 (7161), 419-426.
- Subklewe, M., Geiger, C., Lichtenegger, F. S., Javorovic, M., Kvalheim, G., Schendel, D. J. & Bigalke, I. (2014). New generation dendritic cell vaccine for immunotherapy of acute myeloid leukemia. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 63 (10), 1093-1103.
- Suh, W.-K., Gajewska, B. U. & Okada, H. (2003). The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses. *Nature Immunology*, 4 (9), 899-906.
- Sun, J. C. & Bevan, M. J. (2003). Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science*, 300 (5617), 339-342.
- Suresh, R. & Mosser, D. M. (2013). Pattern recognition receptors in innate immunity, host defense, and immunopathology. *Advances in Physical Education*, 37 (4), 284-291.
- Takeda, K. & Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, 17 (1), 1-14.
- Tel, J., Aamtzen, E. H., Baba, T., Schreibelt, G., Schulte, B. M., Benitez-Ribas, D., Boerman, O. C., Croockewit, S., Oyen, W. J. G., van Rossum, M., Winkels, G., Coulle, P. G., Punt, C. J. A., Figdor, C. G. & de Vries, J. M. (2013). Natural Human Plasmacytoid Dendritic Cells Induce Antigen-specific T-Cell Responses in Melanoma Patients. *Cancer Research*, 73 (3), 1063-1075.
- Tillack, C. (2014). Anti-TNF antibody-induced psoriasiform skin lesions in patients with inflammatory bowel disease are characterised by interferon- γ -expressing Th1 cells and IL-17A/IL-22-expressing Th17 cells and respond to anti-IL-12/IL-23 antibody treatment. *Gut*, 63 (4), 567-577.
- Trinchieri, G. (1998). Proinflammatory and Immunoregulatory Functions of Interleukin-12. *Intern. Rev. Immunology*, 16 (3-4), 365-396.

- Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 3 (2), 133-146.
- Tseng, S.-Y., Otsuji, M., Gorski, K., Huang, X., Slansky, J. E., Pai, S. I., Shalabi, A., Shin, T., Pardoll, D. M. & Tsuchiya, H. (2001). B7-DC, a New Dendritic Cell Molecule with Potent Costimulatory Properties for T Cells. *Journal of Experimental Medicine*, 193 (7), 839-846.
- U.S. Food and Drug Administration. (2017). Hematology/Oncology (Cancer) Approvals & Safety Notifications. Verfügbar unter <https://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm279174.htm> [29.03.2017]
- Van den Broeke, L. T., Daschbach, E., Thomas, E. K., Andringa, G. & Berzofsky, J. A. (2003). Dendritic cell-induced Activation of Adaptive and Innate Antitumor Immunity. *The Journal of Immunology*, 171 (11), 5842-5852.
- Van Tendeloo, V. F., Ponsaerts, P., Lardon, F., Nijs, G., Lenjou, M., Van Broeckhoven, C., Van Bockstaele, D. R. & Berneman, Z. N. (2001). Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood*, 98 (1), 49-56.
- Verweij, C. L., Geerts, M. & Aarden, L. A. (1991). Activation of interleukin-2 gene transcription via the T-cell surface molecule CD28 is mediated through an NF-kB-like response element. *The Journal of Biological Chemistry*, 266 (22), 14179-14182.
- Weaver, C. T., Harrington, L. E., Mangan, P. R., Gavrieli, M. & Murphy, K. M. (2006). Th17: An Effector CD4 T Cell Lineage with Regulatory T cell Ties. *Immunity*, 24 (6), 677-688.
- Wimmers, F., Schreiber, G., Sköld, A. E., Figdor, C. G. & De Vries, I. M. (2014). Paradigm shift in dendritic cell-based immunotherapy: from in vitro generated monocyte-derived DCs to naturally circulating DC subsets. *Frontiers in Immunology*, 5 (156), 1-12.
- Xu, H.-M. (2014). Th1 cytokine-based immunotherapy for cancer. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 13 (5), 482-494.
- Yanagihara, S., Komura, E., Nagafune, J., Watarai, H. & Yamaguchi, Y. (1998). EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *Journal of Immunology*, 161 (6), 3096-3102.
- Yee, C., Thompson, J. A., Byrd, D., Riddell, S. R., Roche, P., Celis, E. & Greenberg, P. D. (2002). Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect

of transferred T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (25), 16168-16173.

Yoshinaga, S. K., Whoriskey, J. S., Khare, S. D., Sarmiento, U., Guo, J., Horan, T., Shih, G., Zhang, M., Coccia, M. A., Kohno, T., Tanfuri-Bladt, A., Brankow, D., Campbell, P., Chang, D., Hui, A., McCabe, S. M., Scully, S., Shahinian, A., Shaklee, C. L., Van, G., Mak, T. W. & Senaldi, G. (1999). T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature*, 402 (6763), 827-832.

Yoshinaga, S. K., Zhang, M., Pistillo, J., Horan, T., Khare, S. D., Miner, K., Sonnenberg, M., Boone, T., Brankow, D., Dai, T., Delaney, J., Han, H., Hui, A., Kohno, T., Manoukian, R., Whoriskey, J. S. & Coccia, M. A. (2000). Characterization of a new human B7-related protein: B7RP-1 is the ligand to the co-stimulatory protein ICOS. *International Immunology*, 12 (10), 1439-1447.

Zhou, L. J. & Tedder, T. F. (1996). CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93 (6), 2588-2592.

Zhu, J. (2015). T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. *Cytokine*, 75 (1), 14-24.

Zou, W. & Restifo, N. P. (2010). T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 10 (4), 248-256.

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
α	Anti-
Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
BSA	Bovines Serum Albumin
CAR	<i>Chimeric antigen receptor</i>
CCL	Chemokinligand
CCR	Chemokinrezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD(x) ⁺	Positiv für ein Oberflächenmolekül x
CD40-L	CD40-Ligand
CDR	Zytosolischer DNA-Rezeptor
CLR	C-Typ-Lektin-Rezeptor
CO ₂	Kohlendioxid
CpG	Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid
CTL	Zytotoxische T-Zelle
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds-RNA	Doppelstrang-Ribonukleinsäure
DZ	Dendritische Zelle
EAE	Experimentelle Autoimmunenzephalitis
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxP3	<i>Forkhead box protein P3</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
g	Erdbeschleunigung
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HSA	Humanes Serum Albumin
ICOS	<i>Inducible costimulator</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KIR	Killer inhibitory receptor
KLH	<i>Keyhole limpet hemocyanin</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-reiche Wiederholungen
M.	Morbus
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
MBP	Basisches Myeloprotein
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
min	Minute(n)
ml	Milliliter

mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NaCl	Natrium-Chlorid
NAZ	Nichtadhärente Zelle(n)
NF-κB	Nekrosefaktor-κB
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NLR	<i>Nucleotide binding oligomerization domain-like receptor</i>
Pam ₃ Cys	Tripalmitol-S-Glycerilcysteinyl
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD	<i>Programmed cell death protein</i>
PD-L	<i>Programmed death-ligand</i>
PE	Phycoerythrin
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
Poly-(I:C)	Polyinosin-Polycytidylsäure
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
R848	Resiquimod
RLR	<i>Retinoid induced gene-I-linke receptor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde(n)
ss-RNA	Einzelstrang-Ribonukleinsäure
SSC	<i>Side scatter</i>
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF-β	<i>Tissue growth factor β</i>
T _H -Zellen	T-Helfer-Zelle(n)
TIR-Domäne	Toll-/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor

9 Veröffentlichung

Lichtenegger F. S., Müller K., **Otte B.**, Beck B., Hiddemann W., Schendel D. J. und Subklewe M. (2012)

CD86 and IL-12p70 Are Key Players for T Helper 1 Polarization and Natural Killer Cell Activation by Toll-Like Receptor-Induced Dendritic Cells

PLoS One. 7(9): e44266.

10 Danksagung

Danken möchte ich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Marion Subklewe für die Überlassung dieses Themas und die herzliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe. Ich habe das fröhliche und kollegiale Arbeitsklima sehr geschätzt.

Außerdem danke ich Herrn Dr. med. Felix Lichtenegger für die kompetente Betreuung, für die stets konstruktive Kritik und die gegen Ende aufgebrauchte Geduld.

Allen Mitarbeitern der AG Subklewe bin ich zu größtem Dank verpflichtet für die tatkräftige Unterstützung bei der täglichen Arbeit im Labor. Hervorzuheben sind meine Mitdotorandin Katharina Müller, der ich eine rasche und kompetente Einarbeitung in die experimentellen Methoden zu verdanken habe. Außerdem ist Patrick Palluch zu nennen, der mit seinem Berliner Humor einige lange Stunden im Labor auflockerte und mir stets hilfsbereit zur Seite stand.

Auch möchte ich Freunden, Familie und Kommilitonen danken, die mir regelmäßig ihr Blut spendeten, welches ich für meine wöchentlichen Experimente dringend benötigte.

Besonders danke ich Dr. med. Florian Horn für seinen Optimismus, Hartnäckigkeit und die fortwährende seelische Unterstützung.

Zuletzt danke ich meinen Eltern, insbesondere meiner Mutter für den grammatikalischen Feinschliff, und meiner Schwester Stephanie, die immer an mich geglaubt und mich stets unterstützt haben.

Eidesstattliche Versicherung

Otte, Bettina

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Die Rolle von Kostimulation und IL-12 bei der Aktivierung von T-Zellen und NK-Zellen durch TLR-maturatione dendritische Zellen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Berlin, 10.03.2018

Ort, Datum

Bettina Otte

Unterschrift Doktorandin/Doktorand