

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

in der

Medizinischen Klinik Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Strategien der Gewinnung dendritischer Zellen aus humanen Monozyten
zur Tumor-Immuntherapie:
Vergleich von Interleukin-4 mit
Interferon-alpha als Differenzierungsfaktoren**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Katrin Pohl

aus München

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. S. Endres

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. S. K. Bohlander
Priv. Doz. Dr. med. G. Längst

Mitbetreuung: Priv. Doz. Dr. med. A. Eigler, Dr. med. M. Dauer

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 10.03.2005

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Ziele der Arbeit	1
1.2 Physiologie der dendritischen Zellen	2
1.3 Interleukin-4 als Differenzierungsfaktor für Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen	5
1.3.1 Historie von Interleukin-4	5
1.3.2 Physiologische Bedeutung von Interleukin-4	5
1.3.3 Klinische Bedeutung von Interleukin-4	6
1.3.4 Rolle von Interleukin-4 bei der Generierung dendritischer Zellen <i>in vitro</i>	7
1.4 Interferon- α als Differenzierungsfaktor für Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen	8
1.4.1 Historie der Interferone	8
1.4.2 Physiologische Bedeutung der Interferone	9
1.4.3 Klinische Bedeutung der Interferone	10
1.4.4 Rolle der Interferone bei der Generierung dendritischer Zellen <i>in vitro</i>	11
2. Material und Methoden	14
2.1 Generierung dendritischer Zellen aus Monozyten	14
2.1.1 Reagenzien	14
2.1.2 Kulturmedium	14
2.1.3 Isolierung humaner Monozyten	14
2.1.4 Differenzierung dendritischer Zellen	15
2.1.5 Stimulation der dendritischen Zellen	16
2.2 Durchflusszytometrie	17

III

2.2.1	Antikörper	17
2.2.2	Immunphänotypisierung dendritischer Zellen	17
2.2.3	Bestimmung der Zellvitalität	18
2.3	Beurteilung der Endozytosefähigkeit	18
2.4	Rasterelektronenmikroskopie	18
2.5	Zytokinnachweis	19
2.6	T-Zell-Proliferationsbestimmung	19
2.7	Statistik	21
3.	Ergebnisse	22
3.1	Vergleich der Morphologie der Monozyten nach sechstägiger Kultur mit Interferon- α oder Interleukin-4	22
3.2	Vergleich der Pinozytose der Monozyten nach sechstägiger Kultur mit Interferon- α oder Interleukin-4	24
3.3	Vergleich der Überlebensrate der Monozyten nach sechstägiger Kultur mit Interferon- α oder Interleukin-4	26
3.4	Ausreifung der mit Interferon- α inkubierten Monozyten zu dendritischen Zellen durch Zugabe von Interleukin-4	27
3.5	Stärkere Expression des Chemokinrezeptors CCR 7 durch Zugabe von Interleukin-4	32
3.6	Ausreifung dendritischer Zellen innerhalb von nur 24 Stunden durch Zugabe von Interleukin-4	34

3.7	Eingeschränkte Kapazität zur Stimulation von T-Zellen der mit Interferon- α behandelten dendritischen Zellen	36
3.8	Vergleich der Zytokinproduktion der beiden Differenzierungsstrategien	39
4.	Diskussion	44
4.1	Überblick über die Ergebnisse	44
4.2	Methodendiskussion	45
4.2.1	Ableitung dendritischer Zellen aus humanen Monozyten durch Zellkulturen	45
4.2.2	Generierung dendritischer Zellen mit Interferon- α	47
4.2.3	Bestimmung von Zytokinen mittels ELISA	47
4.3	Eigene Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur	48
4.4	Klinische Relevanz	52
5.	Zusammenfassung	53
6.	Literatur	55
	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	72
	Danksagung	74
	Veröffentlichungen	75
	Lebenslauf	77

1. Einleitung

1.1 Ziele der Arbeit

Dendritische Zellen nehmen als hochspezialisierte antigenpräsentierende Zellen eine zentrale Rolle in der Induktion und Regulation von Immunantworten ein (Banchereau et al. 2000).

Diese Eigenschaft begründet den Einsatz dendritischer Zellen in klinischen Studien, die eine Vakzinierung bei Tumorerkrankungen zum Ziel haben.

Dabei können dendritische Zellen aus den frühesten identifizierbaren Zellen der T-Zell-Reihe, den CD (cluster of differentiation) 34-positiven (CD34+) humanen Stammzellen abgeleitet werden, die zwar in der fetalen Leber, dem Dottersack und dem Knochenmark Neugeborener, selten jedoch im peripheren Blut und im Knochenmark Erwachsener zu finden sind. Hierzu ist die Stimulation der Proliferation *in vivo* durch Zugabe von Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) notwendig (Bernhard et al. 1995), während aus dem Nabelschnurblut Neugeborener die CD34+ Stammzellen in größerer Anzahl gewonnen werden können (Caux et al. 1992, Romani et al. 1994, Bernhard et al. 1995).

Als Standardmethode gilt aber die Inkubation von Monozyten mit GM-CSF und Interleukin-4 über fünf bis sieben Tage, um unreife dendritische Zellen zu generieren (Sallusto und Lanzavecchia 1994). Damit diese ihre vollständige T-Zell-stimulatorische Kapazität entwickeln, müssen die Zellen über 48 Stunden mit bakteriellen, viralen oder T-Zell-assoziierten Substanzen stimuliert werden. Da nicht bekannt ist, ob diese Bedingungen mit der Situation *in vivo* vergleichbar sind, wurde Interleukin-4 als Differenzierungsfaktor in der Ableitung dendritischer Zellen aus humanen Monozyten in Frage gestellt. Zusätzlich sind bereits negative Effekte dieses Zytokins auf den Prostaglandinmetabolismus und somit auf bestimmte Funktionen dendritischer Zellen beschrieben worden (Turner et al. 2001).

In den letzten Jahren wurden Typ I-Interferone als potente Induktoren der Ausreifung von dendritischen Zellen aus Monozyten beschrieben (Radvanyi et al. 1999, Santini et al. 2000, Paquette et al. 1998). Ein systematischer Vergleich mit dem bisher als Standardfaktor für die Differenzierung dendritischer Zellen geltenden Interleukin-4 wurde bislang nicht durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Interleukin-4 und Interferon- α als Differenzierungsfaktoren zur Ableitung dendritischer Zellen aus humanen Monozyten systematisch gegenübergestellt.

Ziel der Arbeit war es, herauszufinden, ob dendritische Zellen in Abhängigkeit des Differenzierungsfaktors unterschiedliche Funktionen aufweisen, ob deutliche Vorteile von Interleukin-4 in der Generierung dendritischer Zellen aus Monozyten abgrenzbar sind oder Interleukin-4 aufgrund von Funktionseinschränkungen der resultierenden dendritischen Zellen durch Interferon- α ersetzt werden kann. Beurteilt wurden die dendritischen Zellen bezüglich ihrer Oberflächenmarkerexpression, ihrer Fähigkeit zur Antigenaufnahme, ihres Überlebens in den Zellkulturen, ihrer Fähigkeit, T-Zellen zur Proliferation anzuregen und ihrer Zytokinproduktion.

1.2 Physiologie der dendritischen Zellen

Das vorherrschende humane *in-vivo*-Modell geht von drei Typen dendritischer Zellen aus, die alle der CD34+ pluripotenten Knochenmarkszelle entstammen (Shortman und Liu 2002). Unterschieden wird zwischen einem myeloiden Differenzierungsweg zu entweder CD14-positiven (CD14+), CD11-positiven (CD11+) Monozyten oder zu CD14-negativen (CD14-), CD11+ Zellen, und einem lymphoiden Differenzierungsweg zu CD14-, CD11 negativen (CD11-) Vorläuferzellen (Hart 1997). Die myeloiden Monozyten können zu unreifen dendritischen Zellen differenzieren und antigenpräsentierende Funktionen mit hoher immunstimulatorischer Fähigkeit annehmen (Steinman 1991, Schuler et al. 1993, Williams et al. 1994). Epidermale Langerhans-Zellen entstehen aus den CD14- myeloiden Vorläuferzellen (Ito et al. 1999). Die lymphoiden Vorläuferzellen, auch plasmazytoide Zellen genannt, nehmen keine antigenpräsentierende Rolle ein, sondern produzieren nach Stimulation und Ausreifung Interferon- α (Cella et al. 1999). Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen dendritischen Zellen werden *in vitro* aus Monozyten abgeleitet und stehen bezüglich ihrer Charakteristika der myeloiden Reihe *in vivo* nahe.

Dendritische Zellen zeichnen sich *in vivo* durch ihre Mobilität aus. So wandern die aus Vorläuferzellen des Knochenmarks entstandenen unreifen Zellen über den Blutstrom in nicht lymphoides Gewebe und verbleiben dort. Erreichen sie Signale in Form von Chemokinen, so

können sie aufgrund bestimmter Chemokinrezeptoren (CCR) auf diese Liganden reagieren und an dem Ort der Antigenerkennung akkumulieren. So gilt RANTES (regulated on activation, normal T expressed and secreted) als Ligand für die auf unreifen dendritischen Zellen exprimierten Chemokinrezeptoren 1 und 5 (CCR 1, CCR 5), MIP-1 α (macrophage inflammatory protein) als Ligand für den Chemokinrezeptor CCR 1 und MCP (monocyte chemoattractant protein) als Ligand für den Chemokinrezeptor CCR 2. Entsprechende Chemokine können für die Chemokinrezeptoren CCR 4 und 5 nachgewiesen werden (Dieu et al. 1998). Weitere, für unreife dendritische Zellen typische Oberflächenmarker stellen Mannoserezeptoren (Sallusto et al. 1995), die Fc γ -Rezeptoren CD32 und CD64 (Fanger et al. 1996) und der Marker DEC-205 (Jiang et al. 1995) dar.

Dendritische Zellen können Antigene je nach deren Beschaffenheit durch Makropinozytose, Rezeptor-vermittelte Endozytose (Sallusto et al. 1995) oder Phagozytose (Albert et al. 1998) aufnehmen. Nach Aufnahme der Antigene in der Peripherie unterliegen die Zellen einem Reifungsprozess. Dieser Reifungsprozess kann durch pathogenassoziierte Moleküle wie bakterielle Lipopolysaccharid (LPS), bakterielle Desoxyribonucleinsäure (DNA; Sparwasser et al. 1998) oder Ribonucleinsäure (RNA; Cella et al. 1999) hervorgerufen werden. Das Zusammenspiel bestimmter proinflammatorischer und antiinflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin-1 und -6 und Prostaglandine (PGE) beeinflussen die Ausreifung dendritischer Zellen ebenso wie bestimmte von T-Zellen ausgehende Signale (Jonuleit et al. 1997).

Dendritische Zellen verlieren nach Aktivierung ihre endozytotischen und phagozytotischen Rezeptoren und unterliegen einer Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 sowie der Expression an Major Histocompatibility Complex (MHC) I- und II-Molekülen. Sie verändern auch die Expression der Chemokinrezeptoren (Dieu et al. 1998) und wandern daraufhin über das Lymphsystem zu den drainierenden Lymphknoten (Sozzani et al. 2000). Eine bedeutende Rolle nimmt hierbei der Chemokinrezeptor 7 ein, der auf die Chemokine MIP-3 β und SLC (secondary lymphoid-tissue chemokine) reagiert, die unter anderem in lymphatischen Gefäßen (Saeki et al. 1999) und in den parakortikalen Arealen der Lymphknoten nachgewiesen werden konnten (Dieu et al. 1998, Sallusto et al. 1998). Erreichen die dendritischen Zellen diese parakortikalen Areale, präsentieren sie die prozessierten Antigene den sich dort befindlichen T-Zellen, insbesondere den CD4⁺ T-Zellen, und regen somit die angeborene Immunantwort an. Wenn eine für das Antigen spezifische,

jedoch nicht weiter differenzierte „naive“ T-Zelle andockt, wird die Bindung verstärkt und die T-Zelle durch ein Doppelsignal aktiviert. Das Doppelsignal besteht 1. aus der Erkennung des MHC-I oder II gebundenen Antigens durch den T-Zell-Rezeptor mit seinem Co-Rezeptor (CD4 bei den T-Helferzellen, CD8 bei den zytotoxischen T-Zellen) und 2. aus einer Interaktion zwischen kostimulatorischen Molekülen der antigenpräsentierenden Zellen auf der einen und entsprechende Liganden der T-Zellen auf der anderen Seite. Die „naiven“ T-Zellen wandeln sich in unreife Effektorzellen (Th_0) um. Die Aktivierung naiver CD4⁺ T-Zellen konnte sowohl *in vitro* (Inaba et al. 1984) als auch *in vivo* nachgewiesen werden (Inaba et al. 1983, Inaba et al. 1990, Sornasse et al. 1992, Flamand et al. 1994, Henry et al. 1999). Aus den Effektorzellen entstehen bei weiterer Differenzierung entweder inflammatorische T-Zellen vom Typ 1 (Th_1), die Makrophagen mittels Interferon- γ (IFN- γ) aktivieren, oder T-Helferzellen vom Typ 2 (Th_2), die für die B-Zell-Aktivierung notwendig sind. Die Interaktion zwischen den antigenspezifischen Th_2 -Zellen und den CD40⁺ B-Zellen über CD40-Ligand (CD40L) und Interleukin-4 (Clark und Ledbetter 1994) führt zu einer primären Antikörperproduktion. Ebenfalls über den auf CD4⁺ T-Zellen exprimierten CD40L kommt es zu einer Ausreifung der unreifen zu reifen dendritischen Zellen (Cella et al. 1996). Auch andere Substanzen wie bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), Prostaglandin E₂ (PGE₂), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), die Zytokine Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin-6 (IL-6) und bakterielle DNS-Motive (Hartmann et al. 1999) fördern den Reifungsprozeß der dendritischen Zellen, der sich in veränderter Expression von spezifischen Oberflächenmarkern und der Produktion bestimmter Zytokine äußert.

So zeigt sich bei den ausgereiften dendritischen Zellen eine gesteigerte Expression der Adhäsionsmoleküle CD11, CD54 und CD58, der kostimulatorischen Moleküle CD80 (B7.1), CD86 (B7.2) und CD40, außerdem der typischen Reifemarker CD83 und CMRF 44 (Hock et al. 1994, Zhou et al. 1992) und der MHC-Moleküle, die nach Antigenaufnahme zum Zwecke der Präsentation der prozessierten immunogenen Peptide an der Zelloberfläche zu finden sind (Cella et al. 1997). Die Produktion der Zytokine IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α durch Makrophagen wird über die Aktivierung dendritischer Zellen beeinflusst (Cella et al. 1996). Typischerweise sezernieren reife dendritische Zellen das Zytokin Interleukin-12, das sowohl in der Induktion angeborener als auch erworbener Immunabwehr eine Schlüsselrolle einnimmt (Trinchieri 1998).

1.3 Interleukin-4 als Differenzierungsfaktor für Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen

1.3.1 Historie von Interleukin-4

Interleukin-4 wurde 1982 als T-Zell-abgeleiteter Wachstumsfaktor für B-Zellen entdeckt (Howard et al. 1982). Damals beschrieben die Autoren Interleukin-4 als Kofaktor der Proliferation von B-Zellen, nachdem diese mit Anti-IgM-Antikörpern stimuliert worden waren. Inzwischen sind weitere biologische Funktionen des Interleukin-4 bekannt. Viele Zelltypen, vor allem hämatopoietischen Ursprungs, exprimieren den Rezeptor für Interleukin-4. Dazu zählen neben den B-Zellen auch T-Lymphozyten, Natürliche Killer (NK)-Zellen, mononukleäre Phagozyten, Mastzellen, Fibroblasten und hämatopoietische Stammzellen. Diese hohe Präsenz der Rezeptoren erklärt auch die physiologische Rolle von Interleukin-4. Dabei können zwei Rezeptortypen unterschieden werden, wobei einer der beiden Rezeptoren auch Signale von Interleukin-13 weiterleitet (Chomarat und Banchereau 1997). Produziert wird Interleukin-4 von Th₂-Zellen, nachdem diese aktiviert worden sind, und hält somit eine Th₂-Immunantwort aufrecht (Abbas et al. 1996).

1.3.2 Physiologische Bedeutung von Interleukin-4

Physiologisch lässt sich ein Effekt von Interleukin-4 auf B- und T- Lymphozyten sowie auf Stammzellen nachweisen. Interleukin-4, ein 15-kDa Protein kodiert auf Chromosom 5, beeinflusst die Differenzierung der B-Zellen und führt zu einer vermehrten Produktion insbesondere von Immunglobulin E (Jabara et al. 1990), von dem bekannt ist, dass es eine zentrale Rolle in der Pathogenese der allergischen Entzündungen einnimmt. In Zusammenhang mit allergischen Erkrankungen wird Interleukin-4 auch von Mastzellen produziert und sezerniert. Daneben induziert Interleukin-4 bei den B-Lymphozyten auch die Produktion von Immunglobulin G und M (Defrance et al. 1988). Naive T-Zellen differenzieren unter dem Einfluss von Interleukin-4 zu Th₂-Zellen (D'Andrea et al. 1995), wobei Interleukin-4 von den T-Zellen selbst gebildet wird. Bei den hämatopoietischen Stammzellen induziert Interleukin-4 die Proliferation der Thymozyten, hemmt jedoch über Wachstumsfaktoren das Wachstum von Thymus-Epithel Zellen.

Interleukin-4 zeigt darüber hinaus eine antiinflammatorische Aktivität, indem es die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und hämatopoietischen Wachstumsfaktoren herunterreguliert, die von Monozyten und Makrophagen nach Stimulation mit LPS produziert worden sind (D'Andrea et al. 1995). Interleukin-4 gilt als klassisches Th₂-Zytokin. Es konnte aber auch ein positiver Feedbackmechanismus von Interleukin-4 auf das Th₁-System über indirektem Weg durch die Förderung der Produktion und Bioaktivität des Th₁ Zytokins Interleukin-12 festgestellt werden (Hochrein et al. 2000, Ebner et al. 2001, Kalinski et al. 2000). Interleukin-4 könnte daher zu einer Änderung einer laufenden Th₂-Immunantwort in eine Th₁-Antwort beitragen (Bullens et al. 2001).

1.3.3 Klinische Bedeutung von Interleukin-4

In neuesten Untersuchungen konnte nach Infusion von GM-CSF und Interleukin-4 ein positiver Effekt von Interleukin-4 auf die Anzahl und Morphologie der dendritischen Zellen *in vivo* nachgewiesen werden. Dabei wurde in einem Mausmodell Interleukin-4 über sieben Tage kontinuierlich infundiert und anschließend die Anzahl der dendritischen Zellen mit Expression der MHC-Komplexe bestimmt. Es konnte eine gesteigerte Expression der MHC-Komplexe nachgewiesen werden, die Funktion der dendritischen Zellen war nicht eingeschränkt. Die Autoren sehen hierin eine mögliche Zukunft der *in-vivo*-Therapie bei Tumor- und Viruserkrankungen mit Interleukin-4 (Basak et al. 2002).

Daneben hebt Interleukin-4 die hemmende Wirkung von Tumorzellen auf die Differenzierung dendritischer Zellen auf. Tumorzellen setzen Interleukin-6 und M-CSF (Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor) frei, die die Differenzierung von CD34+ Vorläuferzellen in dendritische Zellen hemmt. Interleukin-4 wirkt dem entgegen, indem es die Freisetzung von M-CSF und Interleukin-6 durch Rezeptorblockade reduziert (Menetrier-Caux et al. 2001).

Patienten mit Psoriasis wurden in einer prospektiven Studie mit Interleukin-4 therapiert. Interleukin-4 konnte die Produktion von Interleukin-8 und Interleukin-19 senken, die direkt mit der Erkrankung in Verbindung stehen. Die Th₂-Immunantwort konnte durch eine um das zwei- bis dreifach gesteigerte Anzahl an CD4+ T-Zellen angeregt werden. Die Therapie wurde bei allen Patienten gut toleriert, bei allen Probanden zeigte sich bereits nach sechs Wochen eine Abnahme der Beschwerden, bei 75 % sogar um über 68 % (Ghoreschi et al. 2003).

Andere klinische Studien untersuchen den therapeutischen Effekt von Interleukin-4 bei Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie (CLL). Die bisher nachgewiesene antitumorale Aktivität des Zytokins *in vitro* konnte bisher jedoch *in vivo* nicht nachgewiesen werden. Während der achtwöchigen Gabe von Interleukin-4 nahm die Zahl der Lymphozyten bei 71 % der Patienten zu. Nach Beendigung der Therapie kam es allerdings meist zu einem Abfall der Zellzahl. Als Therapieerfolg konnte nur eine Abnahme der Größe betroffener Lymphknoten festgestellt werden (Lundin et al. 2001). Weitere Untersuchungen bezüglich dieser Therapieoption werden bei der CLL durchgeführt (Kay und Pittner 2003).

1.3.4 Rolle von Interleukin-4 bei der Generierung dendritischer Zellen *in vitro*

Dendritische Zellen können *in vitro* aus CD14+ Monozyten in zwei Schritten generiert werden (Sallusto et al. 1994, Romani et al. 1996, Ebner et al. 2001). Zunächst bewirkt die Kultur mit GM-CSF und Interleukin-4 die Entwicklung unreifer dendritischer Zellen mit hoher Kapazität zur Antigenaufnahme. In einem zweiten Schritt induzieren proinflammatorische Zytokine eine Ausreifung zu CD83+ dendritischen Zellen, die vermehrt MHC-I und -II Komplexe, kostimulatorische Moleküle und den Chemokinrezeptor CCR 7 exprimieren.

Als dendritische Zellen erstmals aus Vorläuferzellen des peripheren Blutes gewonnen wurden, waren einige der heute für dendritische Zellen spezifischen Oberflächenmarker noch nicht bekannt. Daher wurde ein besonderes Gewicht auf morphologische Kriterien zur Identifikation dendritischer Zellen gelegt (Caux et al. 1992). Die Ableitung dendritischer Zellen aus Monozyten nach 5-7 tägiger Kultur mit GM-CSF und Interleukin-4 und anschließender Stimulation mit proinflammatorischen, antiviralen oder antigenassoziierten Mediatoren hat sich als Standardprotokoll etabliert. Dadurch konnten die morphologischen Merkmale wie Zellgröße und Zellgranulation, Ausbildung zytoplasmatischer Ausläufer und Klusterbildungen erreicht werden (Romani et al. 1994). Auch die funktionellen Ansprüche mit T-Zell-Proliferation oder Zytokinproduktion, die an reife dendritische Zellen gestellt werden, konnten die auf diesem Differenzierungsweg abgeleiteten Zellen erfüllen (Bender et al. 1996). Daher kamen diese dendritischen Zellen bereits in klinischen Studien zur Therapie von Melanomerkrankungen (Nestle et al. 1998) oder auch des Nierenzellkarzinoms (Turner et al. 1997) mit zum Teil vielversprechenden Ergebnissen zum Einsatz.

Thurner et al. postulierten jedoch einen negativen Effekt des Interleukin-4 in der Differenzierung dendritischer Zellen aus Monozyten (2001). Das Enzym Phospholipase A₂ wird durch Interleukin-4, das in der Generierung dendritischer Zellen verwendet wird, darin gehemmt, Arachidonsäure aus Membranphospholipiden freizusetzen und an der Synthese des plättchenaktivierenden Faktors teilzunehmen (Mehindate et al. 1996, Lin et al. 1993). Laut Thurner et al. ist durch den Mangel an Arachidonsäure eine verminderte Bereitstellung an Eikosanoiden bedingt. Hierzu zählen Prostaglandine, Leukotriene und Lipoxine, die bei der Migration der Leukozyten, bei der Aktivierung natürlicher Killerzellen und bei der Differenzierung von T-Helferzellen eine wichtige Rolle spielen (Serhan et al. 1996). Prostaglandine bewirken zudem eine Ausreifung dendritischer Zellen (Rieser et al. 1997, Jonuleit et al. 1997).

1.4 Interferon- α als Differenzierungsfaktor für Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen

1.4.1 Historie der Interferone

Isaacs und Lindemann beschrieben 1957 das Phänomen der „viralen Interferenz“, bei der Proteine andere Zellen vor Infektion schützen und entdeckten somit vor über 40 Jahren die Interferone (Isaacs und Lindemann 1957). Seither wurden mehrere Arten von Interferon anhand ihrer Oberflächenrezeptoren, ihrer primären Sequenz und ihrer chromosomalen Lokalisation identifiziert (Diaz et al. 1994). Alle Interferone werden heute in zwei Gruppen, Typ I und Typ II Interferone eingeteilt. Bei den Typ I-Interferonen unterscheidet man zwischen Interferon- α , - β , - ω und - τ , die an die gleichen Oberflächenrezeptoren binden, überlappende Funktionen aufweisen und für die mehr als 18 Gene bekannt sind. Für das Typ II Interferon Interferon- γ konnte bisher nur ein Genort identifiziert werden (Byrnes et al. 2001).

1.4.2 Physiologische Bedeutung der Interferone

Als Schlüsselenzyme des angeborenen Immunsystems (Biron et al. 1999) mit immunmodulatorischen und antiviralen Effekten (Pestka et al. 1987, Muller et al. 1994) sind proliferative Einflüsse auf die Differenzierung der T-Zellen zu Effektorzellen bekannt (Heron und Berg 1979, Lindahl-Magnusson et al. 1972). Typ I-Interferone verstärken die Zytotoxizität der T- und NK-Zellen (Lindahl et al. 1972, Djeu et al. 1979) und regulieren die Produktion des Th₁-Zytokins Interleukin-12 durch antigenpräsentierende Zellen (Cousens et al. 1997, Bartholome et al. 1999, Jiang und Dhib-Jalbut 1998). Daneben fördern sie die Proliferation der zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen und verlängern ihre Lebenszeit *in vivo* (Marrack et al. 1999, Tough et al. 1996). Sie spielen eine wichtige Rolle in der Effektorphase einer Immunantwort, indem sie aktivierte T-Zellen vor Apoptose schützen und die Bildung von Gedächtnis-T-Zellen begünstigen (Pilling et al. 1999, Marrack et al. 1999).

Typ I-Interferone werden unter physiologischen Bedingungen in geringem Anteil (Belardelli et al. 1984) und vermehrt bei Infektionen mit Viren oder Bakterien (Belardelli 1995, Bogdan 2000), aber auch bei Kontakt mit infektiösen Komponenten wie LPS, bakterielle DNA und RNA (Cella et al 1999, Kirchner 1984, Eloranta et al. 1997, Kadowaki et al. 2000) produziert. Neben Monozyten und Makrophagen sezernieren B-Zellen Interferon- α (Ferbass et al. 1994). Interferon- β wird vor allem durch Fibroblasten ausgeschüttet (Sehgal und Sagar 1980).

Daneben wurden vor einigen Jahren „natürliche Interferon-produzierende Zellen“ entdeckt, die als periphere, im Blut zirkulierende dendritische Zellen nach Stimulation mit Influenza Virus und CD40L Typ I-Interferone produzieren konnten (Siegal et al. 1999). *In vivo* können diese plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDC) in sekundären Lymphorganen nachgewiesen werden. Sie stimulieren T-Zellen und rufen eine Th₁-Immunantwort hervor, was durch die Wirkung von Interleukin-12 und Typ I-Interferone zusätzlich verstärkt wird (Cella et al. 2000).

1.4.3 Klinische Bedeutung der Interferone

Typ I-Interferone werden in der Therapie unterschiedlicher Erkrankungen wie Autoimmunerkrankungen, viralen Infektionen und malignen Erkrankungen eingesetzt. Interferon- β ist in der Behandlung der Multiplen Sklerose (MS) etabliert. Es ist anzunehmen, dass Zytokine im Rahmen der MS-Pathogenese viele der zellulären Interaktionen regulieren. Eine große Anzahl proinflammatorischer Zytokine und Chemokine (IL-1, IL-2, IL-6, RANTES, TNF- α , IFN- γ) und regulatorischer Zytokine (IL-10, IL-4) wurden im Gehirn, Liquor und peripheren Blut von MS-Patienten nachgewiesen. Bei Auswertung dreier großer, Placebo-kontrollierter, doppelblinder Studien und mehrerer kleiner Studien konnte ein eindeutiger therapeutischer Effekt von Interferon- β bei MS nachgewiesen werden (Weinstock-Guttman und Jakobs 2000, Rudick et al. 1997). Die Anzahl neuer Läsionen wurde reduziert, was in der apparativen Diagnostik anhand der Magnetresonanztomographie nachvollzogen werden konnte (Paty und Li 1993). Bei einer Autoimmunerkrankung wie dem systemischen Lupus erythematosus konnten Blanco et al. nachweisen, dass die Differenzierung zu dendritischen Zellen aus Monozyten abhängig ist von der Höhe der Interferon- α -Konzentration im Serum (Blanco et al. 2001).

Randomisierte, prospektiv-kontrollierte Studien haben gezeigt, dass Patienten mit chronischer Hepatitis B-Virus (HBV)-Erkrankung auf eine antivirale Therapie mit Interferon- α ansprachen. Nach einer Therapie mit Interferon- α über durchschnittlich 50 Monate konnte das Hepatitis B e Antigen (HBeAg) bei der Hälfte der Patienten nicht mehr gemessen werden (Niederau et al. 1996). Als eine Standardtherapie der Hepatitis B gilt derzeit die Gabe von Interferon- α . Einige Interferonpräparationen wurden als Therapeutika der chronischen Hepatitis C untersucht. Die Behandlung der Wahl einer Hepatitis C Infektion ist heute die Kombination von pegyliertem Interferon- α -2a oder -2b und Ribavirin.

Die immunmodulatorischen Eigenschaften des Interferon Typ I versucht man sich im klinischen Gebrauch auch bei der Therapie maligner Erkrankungen zunutze zu machen (Pfeffer et al. 1998). Bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) zeigten 70 bis 80 % der Patienten hämatologische Reaktionen. Im Vergleich zu Chemotherapien hielten die zytogenetischen Reaktionen länger an. Die Kombination aus Chemotherapie und Interferon-Therapie zeigte die vielversprechendsten Therapieerfolge (Wetzler et al. 1995). Auch bei

anderen Erkrankungen stellte sich heraus, dass die Kombination mit Zytostatika, z.B. mit 5-Fluorouracil bei dem kolorektalen Karzinomen oder mit Zidovudine bei AIDS (acquired immune deficiency syndrome) bessere Therapieerfolge erzielen kann (Itri 1992). Patienten mit metastasiertem malignen Melanom oder mit Nierenzellkarzinom profitierten ebenfalls von einer Therapie, die Interferon- α beinhaltet. Bei Therapie des malignen Melanoms sprachen 24 % der Patienten auf eine Therapie mit Interferon- α an im Vergleich zu 17 % der Probanden, die kein zusätzliches Interferon- α erhielten. Bei dem Nierenzellkarzinom lag die Ansprechrate bei 14 % im Gegensatz zu 8 % (Hernberg et al. 1999). Weiss berichtete jedoch über Nebenwirkungen der Therapieversuche mit Interferon- α bei Haarzelleukämie, Kaposi Sarkom oder bei der CML mit grippeähnlichen Symptomen, Müdigkeit, Anorexie sowie Reaktionen des zentralen Nervensystems, die eine Reduktion der Dosierung erforderlich machten (Weiss 1998).

1.4.4 Rolle der Interferone bei der Generierung dendritischer Zellen *in vitro*

Der Einfluss von Typ I-Interferon auf die Differenzierung von Monozyten-Vorläuferzellen zu antigenpräsentierenden Zellen wird unterschiedlich diskutiert. Einige der Untersuchungen ergaben, dass Typ I-Interferone Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen zu potenten Stimulatoren einer Th₁-Immunantwort *in vitro* und *in vivo* ausreifen lassen. So konnten Monozyten bereits nach drei Tagen zu CD 83+/CD 86+ Zellen differenzieren und eine T-Zell-Proliferation stimulieren, wenn Interferon- α zu Interleukin-4, GM-CSF und TNF- α in das Kulturmedium dazugegeben wurde. Dabei kamen niedrige Dosierungen an Interferon- α (10-100 U/ml) zum Einsatz, die einer physiologischen Konzentration entsprachen. Auch nach siebentägiger Inkubation der Monozyten mit GM-CSF und Interleukin-4 sowie TNF- α bewirkte eine Stimulation mit Interferon- α über weitere 24 Stunden eine vermehrte Expression an CD86 (Radvanyi et al. 1999).

Santini et al. inkubierten die Monozyten mit GM-CSF (500 U/ml) plus Interleukin-4 (1000 U/ml) oder GM-CSF plus Typ I-Interferon (500-1000 U/ml). Nach drei Tagen zeigten die mit Interferon- α behandelten Zellen eine vermehrte Expression an CD40, CD80 und CD86, während diese Oberflächenmarker in vergleichbarem Maße bei den mit Interleukin-4 inkubierten Zellen erst nach sechs Tagen Kultur nachweisbar waren. Einige der Zellen beider Bedingungen wurden am dritten Tag mit LPS stimuliert und am sechsten Tag in der FACS-

Analyse miteinander verglichen. Dabei exprimierten die mit Interferon- α behandelten Zellen den Reifemarker CD83 in 30 bis 40 %, während unter der Standardbedingung mit Interleukin-4 kaum CD83 nachweisbar war (Santini et al. 2000). Interferon- α induzierte auch in der Arbeit von Paquette et al. zusammen mit GM-CSF eine Ausreifung dendritischer Zellen, die MHC-II und kostimulatorische Moleküle zunehmend bei Anstieg der Interferon-Konzentration (bis zu 5000 U/ml) exprimierten. Eine Stimulation der autologen T-Zell-Proliferation konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Paquette et al. 1998).

Auch *in vivo* konnte ein Einfluss der Typ I-Interferone auf dendritische Zellen demonstriert werden. So können sie neben der Stimulation einer humoralen Immunantwort durch Verstärkung der Antikörperproduktion Isotyp-Switching der dendritischen Zellen *in vivo* bewirken (Le Bon et al. 2001). Bei Patienten mit CML konnte Interferon- α sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Differenzierung dendritischer Zellen aus mononukleären Zellen hervorrufen (Paquette et al. 2002, Chen et al. 2000).

Andere Publikationen beschreiben dagegen eine hemmende Wirkung von Typ I-Interferon auf die Differenzierung dendritischer Zellen und die Interleukin-12 Produktion.

An Tag 1, Tag 4 und Tag 7 der Kultur wurden Monozyten mit Interleukin-4 und GM-CSF mit oder ohne Zugabe von Interferon- α oder Interferon- β am ersten oder vierten Tag inkubiert. Zusätzlich wurde TNF- α (100 U/ml) am Tag 6 zu allen Bedingungen dazugegeben. Am Tag 10 wurden die Zellen miteinander verglichen. Es zeigte sich ein deutlicher morphologischer Unterschied: die mit Interferon- α oder - β (0,1 oder 1 ng/ml) behandelten Zellen waren kleiner und wiesen kürzere Zellausläufer auf. Daneben hatte die Überlebensrate der Zellen nach Kultur in Interleukin-4 und GM-CSF bei Zugabe von Interferon- α signifikant abgenommen. Die Analyse der Oberflächenmarker dieser Zellen zeigte eine geringere Expression an CD1a, CD40, CD54 und CD80, aber eine vergleichbare Expression an CD86 und MHC-II. CD83 wurde nach beiden Differenzierungsstrategien nur wenig exprimiert. Die Fähigkeit zur Stimulation einer T-Zell-Proliferation war ebenfalls geringer nach Zugabe von Interferon- α oder - β zu der beschriebenen Kultur. Zuletzt wurde die Produktion von Interleukin-12 verglichen. Auch hier waren die mit Interferon Typ I behandelten Zellen deutlich unterlegen (McRae et al. 2000).

Wurde Interferon- α (1000 U/ml) und LPS (1 ng/ml) zusätzlich zu GM-CSF (1000 U/ml) und Interleukin-4 (1000 U/ml) zu Monozyten gesunder Spender dazugegeben, so konnte nach

sechstägiger Kultur ein deutlich erhöhter Zelltod demonstriert werden. Besonders die Kombination mit bakteriellen Stimuli induzierte eine starke Apoptose. Wurden am Tag 7 die unreifen dendritischen Zellen nach Kultur mit GM-CSF und Interleukin-4 mit Interferon- α über weitere drei Tage inkubiert, so konnte keine Differenzierung zu reifen dendritischen Zellen, aber auch keine vermehrte Apoptose nachgewiesen werden. Die Kombination mit LPS, aber auch LPS allein bewirkten hingegen eine Ausreifung zu dendritischen Zellen (Lehner et al. 2001).

2 Material und Methoden

2.1 Generierung dendritischer Zellen aus Monozyten

2.1.1 Reagenzien

Reagenz	Hersteller
GM-CSF	Novartis, Basel, Schweiz
IL-4	Promega, Madison, WI
TNF- α	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
IL-6	Amersham, Buckinghamshire, UK
[3 H]-Thymidin	Amersham Buchler, Freiburg, Deutschland
IFN- α IFN- γ IL-1 β	Strathmann Biotech, Hannover, Deutschland
PGE $_2$ FITC-Dextran	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

2.1.2 Kulturmedium

Alle Kulturen wurden in RPMI 1640 Medium (Biochrom, Berlin, Deutschland) mit 2 % humanem AB-Serum (BioWhittaker, Walkersville, MD), 2 mM L-Glutamin (Life Technologies, Paisley, UK) und 50 U/ml Penizillin (Sigma, München, Deutschland) angesetzt. Um unspezifische Stimulation zu vermeiden, wurden ausschließlich endotoxinarme Medien und Substanzen verwendet. Das hier beschriebene Medium wird im weiteren Verlauf vereinfacht als Kulturmedium bezeichnet.

2.1.3 Isolierung humaner Monozyten

Mononukleäre Zellen (MNC) wurden aus dem peripheren Blut gesunder Probanden durch Standard-Dichtezentrifugation (Boyum 1968) isoliert. Dazu wurde das unter sterilen

Bedingungen entnommene Vollblut mit 50 I.E. Natrium-Heparin pro ml (Boehringer, Mannheim, Deutschland) als Antikoagulant versetzt und auf bereits mit Ficoll-Hypaque-Lösung (spezifische Dichte 1,077 g/ml) vorbereitete Blue Cap-Röhrchen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) geschichtet. Nach Zentrifugation bei 1000 g und 20°C für 20 Minuten (Omnifuge 2.0 RS, Haereus, München, Deutschland) wurde die Fraktion der mononukleären Zellen abgenommen und in drei weiteren Waschschrritten (Zentrifugation bei 400 g, 4°C, 10 min) mit Phosphat-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS, Boehringer, Mannheim, Deutschland) von Thrombozyten und Plasmabestandteilen gereinigt. Nach Inkubation dieser Zellen für eine Stunde bei 37°C und 5 % CO₂ in einer Konzentration von 5x10⁶ Zellen pro ml Kulturmedium in 75-cm²-Zellkulturflaschen (Becton Dickinson, New Jersey, USA) konnten Monozyten durch Entfernen des Überstandes und durch zweimaliges Spülen der Kulturflaschen mit PBS als adhärenente Zellpopulation isoliert werden. Überstände ergaben sich aus nicht adhärenenten Zellen (NAZ) wie Leukozyten, Lymphozyten und Erythrozyten. Diese Waschschrritte spielen für die Reinheit der Monozyten und somit später auch der dendritischen Zellen eine entscheidende Rolle. Anschließend wurden die Kulturflaschen wieder mit Medium befüllt und über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert, um ein spontanes Ablösen der initial adhärenenten Monozyten zu gewährleisten. Für einige Experimente wurden die Monozyten mittels MACS CD14 Isolations-Kit (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland) in hoher Reinheit (> 90 %) gewonnen. Dazu wurden die peripheren mononukleären Zellen mit einem MACS-Farbstoff gekennzeichnet. Mittels magnetischer Anziehungskraft blieben die gefärbten Monozyten an dem Magnetstreifen einer MACS-Säule hängen und konnten so mit hoher Reinheit gewonnen und weiterbehandelt werden.

2.1.4 Differenzierung dendritischer Zellen

Mittels Trypanblau-Färbung konnten nach Inkubation über Nacht und nach Ernten der Zellen die Zellzahl und die Vitalität der Monozyten unter dem Phasenkontrastmikroskop (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) bestimmt werden. Dabei wurden die Monozyten in einer bestimmten Konzentration auf einer Neubauer Zählkammer aufgetragen und gezählt. Nach Berücksichtigung der Konzentration und des Verdünnungsfaktors wurde die Zellzahl berechnet. Die Zelldichte wurde auf 0,5 bis 1,5 x 10⁶ Zellen/ml Kulturmedium eingestellt. Anschließend wurden die Zellsuspensionen mit 1000 U/ml GM-CSF und entweder mit 500 U/ml Interleukin-4 oder 500 U/ml Interferon- α oder auch mit beiden

Differenzierungsfaktoren in gleicher Konzentration supplementiert, je 2 ml auf Sechs-Loch Zellkulturplatten (Becton Dickinson, New Jersey, USA) aufgetragen und für 6 Tage im Brutschrank bei 37° Celsius und 5 % CO₂ Konzentration inkubiert.

2.1.5 Stimulation der dendritischen Zellen

Nach 6 Tagen in Kultur wurden die Zellen intensiv in drei Schritten mit PBS in Kulturflaschen gespült und gewaschen und in Kulturmedium mit GM-CSF (1000 U/ml) resuspendiert. Um eine Ausreifung zu dendritischen Zellen zu bewirken, wurde für 48 Stunden entweder mit einer Kombination aus proinflammatorischen Mediatoren (1000 U/ml TNF- α , 10 ng/ml IL-1 β , 10 ng/ml IL-6 und 1 μ M PGE₂) oder mit CD40L transfizierten BHK (baby hamster kidney) -Zellen plus Interferon- γ (1000 U/ml) stimuliert, jeweils mit oder ohne zusätzliche Gabe von Interleukin-4 (500 U/ml). Die proinflammatorischen Mediatoren gelten als potente Induktoren der Ausreifung Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen (Feuerstein et al. 2000). Die CD40L-transfizierten BHK-Zellen und auch die Kontrollzelllinie, die kein CD40L exprimiert, mussten vor ihrem Einsatz mit 30 Gy bestrahlt und anschließend gewaschen werden, um eine unerwünschte Proliferation zu verhindern. Zudem war ein spezielles Medium mit Geneticinsulfat g418 notwendig, um die transfizierten Zellen zu selektieren, die gegen dieses Antibiotikum immun waren. Diese Zellen erhielten wir freundlicherweise von PD Dr. H. Engelmann, Institut der Immunologie, Universität München, Deutschland. Die dendritischen Zellen wurden den jeweiligen Stimuli für 48 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ ohne weitere Manipulation ausgesetzt. Autologe T-Zellen wurden mit einem Pan-T-Zell Isolations-Kit aus MNC gewonnen. Dabei wurden Monozyten, Granulozyten, B-Zellen, Blutplättchen, frühe erythroide Vorläuferzellen und NK-Zellen mit einem Cocktail aus Hapten-modifizierten CD11b, CD16, CD19, CD36 und CD56 Antikörpern markiert. Diese Nicht-T-Zellen wurden dann wiederum mit magnetischen MACS Micro-Beads markiert, die an einen Anti-Hapten Antikörper gebunden waren. In einer magnetischen Säule wurden diese markierten Nicht-T-Zellen herausgefiltert. Durch dieses System konnte durch negative Selektion eine hohe Reinheit an T-Zellen gewonnen werden.

2.2 Durchflusszytometrie

Alle Messungen erfolgten mit dem Durchflusszytometer FACS-Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Die entsprechenden Daten wurden mit Hilfe der CellQuest Software (Becton Dickinson, Version 3.2.1) analysiert.

2.2.1 Antikörper

Folgende Antikörper und die entsprechenden Isotypen wurden für die FACS-Analyse eingesetzt und von Pharmingen (San Diego, CA, USA) bezogen:

Antikörper	Konjugation
TÜ39	anti-HLA DR, DP, DQ, FITC-konjugiert
L307.4	anti-CD80, PE-konjugiert
2331/FUN-1	anti-CD86, APC-konjugiert
HB15e	anti-CD83, FITC-konjugiert
M5E2	anti-CD14, APC-konjugiert
HII49	anti-CD1a, PE-konjugiert

Die Expression von CCR 7 wurde durch Inkubation mit anti-CCR 7 monoklonalem Antikörper (Klon 3D12, freundlicherweise bereitgestellt von R. Förster, München, Deutschland) gemessen.

2.2.2 Immunphänotypisierung dendritischer Zellen

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden nach Resuspensierung und Waschen der Zellen mit PBS in der Zentrifuge je 10^5 Zellen in 100 μ l PBS suspendiert und mit 10 μ l eines Fluorochrom-markierten monoklonalen Antikörpers auf Eis bei Dunkelheit für 20 Minuten inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift durch Zentrifugation der Zellen mit PBS über 10 Minuten wurden die Messungen unverzüglich vorgenommen. Für jeden Ansatz wurden mindestens 10 000 Ereignisse im auf lebende Zellen gerichteten Zielbereich (vgl. Abb. 4) gemessen.

2.2.3 Bestimmung der Zellvitalität

Die Zellvitalität wurde durchflusszytometrisch mit Hilfe der Farbstoffe Propidium-Jodid (PI) und Annexin V-FITC bestimmt. Dabei kann PI passiv durch die Membran toter Zellen gelangen, während vitale Zellen bei fehlender Permeabilität für PI nicht angefärbt werden. Annexin bindet an Phosphatidylserin, das bei Zellen auf der Zelloberfläche festgestellt werden konnte, die als apoptotische Zellen bezeichnet werden (Gidon-Jeangirard et al. 1999). In dieser Arbeit werden Zellen, die sich deutlich als PI und Annexin V-FITC positive Population abgrenzen lassen als nekrotisch oder tot definiert. 100 µl Zellsuspension wurden mit 3 µl Annexin versetzt, nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wie oben beschrieben in der Zentrifuge gewaschen, anschließend mit 3 µl PI gefärbt und sofort im FACS-Gerät analysiert.

2.3 Beurteilung der Endozytosefähigkeit

Die Aufnahme von Dextranmolekülen mit einem Gewicht von etwa 40.000 DA erlaubt Aussagen über die pinozytotische Aktivität der dendritischen Zellen. Dafür wurden sowohl die mit Interleukin-4 als auch mit Interferon- α kultivierten Zellen für 30 Minuten bei 37°C mit 0,5 mg/ml FITC-markiertem Dextran (Sigma, St. Louis, USA) inkubiert. Als Negativkontrolle zur Beurteilung der unspezifischen Bindung von Dextran an der Zelloberfläche fungierten parallele Ansätze auf Eis. Nach Inkubation folgte ein intensiver Waschvorgang mit PBS, dabei wurde über 10 Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Der FITC-Dextrangehalt der Zellen wurde als Mean Fluoreszenz Intensität (MFI) mittels Durchflusszytometrie (siehe 2.2) semiquantitativ bestimmt. Durch diese Methode kann die Pinozytose nachgewiesen und ein indirekter Nachweis der Phagozytose vorgenommen werden.

2.4 Rasterelektronenmikroskopie

Das Rasterelektronenmikroskop wurde von Prof. Dr. Dr. U. Welsch (Anatomisches Institut, München, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Auf gläsernen Objektträgern wurden die dendritischen Zellen mit niedriger Umdrehungszahl zentrifugiert und mit 2,5 % Glutaraldehyd in PBS (pH 7,4) fixiert. Nach Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 – 70 – 90 – 100 %) für jeweils 20 Minuten wurden die Zellen am

kritischen Punkt in einer CO₂-Druckkammer getrocknet und mit Goldpartikeln bedampft. Anschließend wurden die Zellen in einem ISM-35CF Rasterelektronenmikroskop (JEOL, Tokyo, Japan) untersucht und fotografiert. Die entsprechenden Abbildungen wurden mit Adobe Photoshop Software (Adobe Systems, Version 3.0) bearbeitet.

2.5 Zytokinnachweis

Am sechsten Tag wurden die antigenpräsentierenden Zellen für 48 Stunden unter verschiedenen Bedingungen (siehe 2.1.5) stimuliert. Anschließend wurden die Überstände geerntet, um die Produktion von IL-12, IL-10 und TNF- α mit kommerziell erhältlichen Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) - Kits messen zu können. Bei IL-12 wurden sowohl IL-12 p40 als auch das bioaktive p70 Heterodimer bestimmt (Bender Med Systems, Wien, Österreich). Bei der Messung von IL-10 und TNF- α kamen OptEIA Sets von Pharmingen (San Diego, CA, USA) zum Einsatz. Der ELISA kann die Konzentration löslicher Zytokine und Chemokine messen und quantifizieren. Zunächst werden dabei spezifische Anti-Zytokin-Antikörper als erste Schicht unspezifisch an 96-well-Rundbodenplatten (Becton-Dickinson, New Jersey, USA) gebunden. Nach Proteinabsättigung und Waschschrinen werden die zu testenden antigenhaltigen Lösungen auf die Unterlage pipettiert. Nach Inkubation und weiteren Waschschrinen wird auch hier ein enzymmarkierter Indikatorantikörper zugegeben, der wie der erste Antikörper spezifisch für das gesuchte Zytokin sein muss. Durch die Reaktion eines im letzten Schritt zugegebenen Testsubstrats, das nach Spaltung durch das Enzym farbig wird, kann die Zytokinkonzentration über jeweils erstellte Eichkurven nach Anleitung der Hersteller quantifiziert werden.

2.6 T-Zell-Proliferationsbestimmung

Die T-Zell-Proliferationsessays wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. R. Wank (Institut für Immunologie, Universität München) durchgeführt.

Bei der allogenen gemischten Lymphozytenkultur (mixed lymphocyte reaction, MLR) wurden die dendritischen Zellen nach 48-stündiger Stimulation geerntet und in Verhältnissen von 1:20 bis 1:80 mit nicht-adhärenten allogenen MNC kokultiviert. Jeweils in Triplikaten

wurden pro Ansatz 2×10^5 MNC plus die entsprechende Zahl an dendritischen Zellen in 200 μ l Kulturmedium in 96-well Rundbodenplatten angesetzt.

Die mit Interleukin-4 oder Interferon- α inkubierten Zellen wurden bei der autologen T-Zell-Proliferation am fünften Tag mit Tetanus-Toxoid (TT) in einer Konzentration von 5 μ g/ml inkubiert. Nach 24 Stunden Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen wurden die Antigen-präsentierenden Zellen geerntet und mit autologen T-Zellen ($2 \times 10^5/200 \mu$ l) ebenfalls in 96-well Rundbodenplatten in Verhältnissen von 1:20 bis 1:320, jeweils in Triplikaten, angesetzt.

Am fünften Tag wurden sowohl bei der allogenen als auch bei der autologen Proliferationsbestimmung die Zellen mit je 1 μ Ci/Loch [3 H]-Thymidin beladen und nach 18 Stunden mittels eines 96 MicroCell Harvesters (Skatron, Transby, Dänemark) auf Filtermatten gefällt und getrocknet. Die Radioaktivität des inkorporierten [3 H]-Thymidins wurde nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit mit einem Betaplate Liquid Scintillation Beta Counter (Wallac Oy, Turku, Finnland) quantifiziert. Anschließend wurde der Mittelwert der Triplikate bestimmt. Einen Überblick über die Methodik erlaubt Abbildung 1.

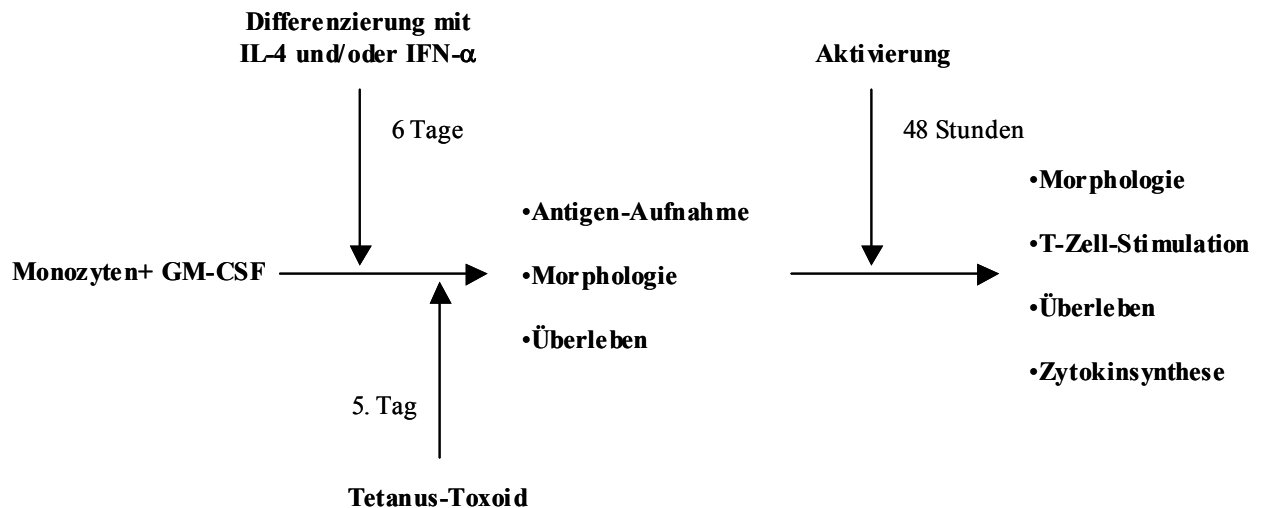


Abbildung 1: Überblick über die Methodik

2.7 Statistik

Ein Teil der Ergebnisse ist als arithmetisches Mittel angegeben. Die Streuung wird als Standardfehler des Mittels (standard error of means, SEM) dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde durch den ungepaarten zweiseitigen Student t-Test ermittelt. Statistische Signifikanz wurde bei Unterschieden mit $p < 0.05$ angenommen und ist für einzelne Experimente in den Abbildungen mit einem Stern gekennzeichnet. Die statistischen Analysen erfolgten mit dem Programm Stat-View 4.51 von Abacus Concepts (Calabasas, CA, USA).

3. Ergebnisse

3.1 Vergleich der Morphologie der Monozyten nach sechstägiger Kultur mit Interferon- α oder Interleukin-4

Die adhärenente Fraktion der MNC wurde entweder nur mit GM-CSF (1000 U/ml), mit GM-CSF und Interleukin-4 (500 U/ml), mit GM-CSF und Interferon- α (500 U/ml) oder mit GM-CSF und Interferon- α plus Interleukin-4 über sechs Tage inkubiert.

Wie erwartet, änderten die nur mit GM-CSF kultivierten Monozyten ihre Morphologie nicht. Der Monozytenmarker CD14 konnte weiterhin auf der Zelloberfläche identifiziert werden, während die kostimulatorischen Moleküle CD86 und CD80 und der Reifemarker CD83 nicht exprimiert wurden (Abb. 2).

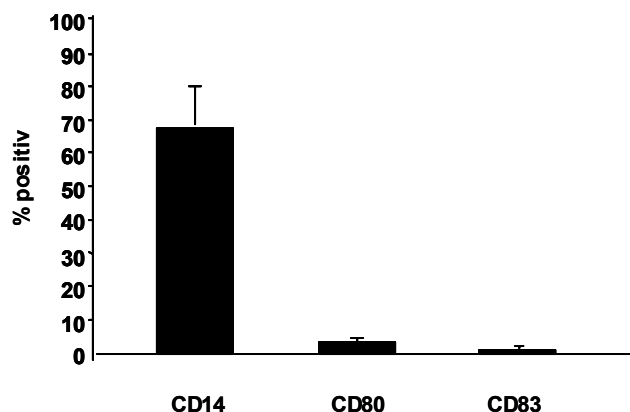


Abbildung 2: Prozentuelle Expression von CD14, CD80 und CD83 der nur mit GM-CSF über sechs Tage kultivierten Monozyten: der Monozytenmarker CD14 wird weiterhin exprimiert, während die für dendritische Zellen typischen Oberflächenmarker CD80 und CD83 kaum nachweisbar sind. Gezeigt sind die Ergebnisse von n=3 unabhängigen Experimenten \pm SEM.

Im Phasenkontrastmikroskop wurde die Morphologie der Zellen beurteilt. Die mit Interleukin-4 inkubierten Zellen entwickelten sich zu unreifen dendritischen Zellen mit deutlicher Zunahme ihrer Zellgröße und Adhärenz an die Plastikoberfläche der Kulturflaschen. Diese Adhärenz der Zellen wie auch die typische Bildung der

Klusterformationen wird auf die Ausbildung stumpfer Ausläufer zurückgeführt. Nach Inkubation mit Interferon- α veränderten sich die Zellen hingegen morphologisch nur gering. Sie blieben kleiner und waren weniger adhären. Die Ausläufer der Zellen waren deutlich kürzer als die der unreifen dendritischen Zellen, auch die typische Klusterbildung konnte nicht demonstriert werden.

In der FACS-Analyse konnten diese Beobachtungen bestätigt werden. Nach Inkubation mit Interferon- α ließen sich die Zellen morphologisch aufgrund ihrer Vorwärts- und Seitwärts-Streueigenschaften als homogene Population von kleineren und wenig granulären Zellen abgrenzen (Abb. 3, links unten). Mit Interleukin-4 inkubierte Zellen waren immunphänotypisch unreife dendritische Zellen: ein Anteil von 86 Prozent exprimierte CD1a, nur 8 Prozent der Zellen waren für CD83 positiv und CD14 negativ (Abb. 3). Im Gegensatz dazu ähnelten Zellen, die über 6 Tage mit Interferon- α inkubiert worden waren, in ihrer Oberflächenmarkerexpression den Monozyten (Abb. 3). CD1a konnte nicht an der Zelloberfläche gemessen werden, während auf über 50 Prozent der Zellen der für Monozyten kennzeichnende Oberflächenmarker CD14 nachgewiesen werden konnte.

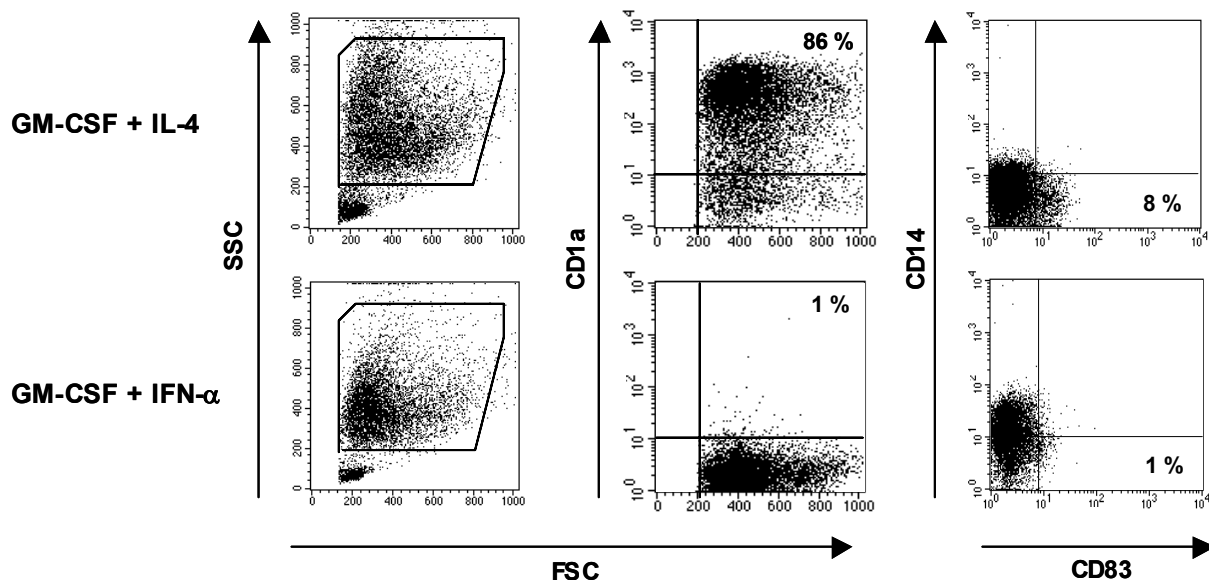


Abbildung 3: Oberflächenmarkerexpression in der FACS-Analyse nach sechs Tagen Kultur der Monozyten mit GM-CSF plus Interleukin-4 oder GM-CSF plus Interferon- α : Interferon- α bewirkt keine Differenzierung der mit GM-CSF inkubierten Monozyten zu dendritischen Zellen. Lebende Zellen wurden aufgrund ihrer Vorwärts- (FSC) und Seitwärts (SSC)-Streueigenschaften im links angegebenen Bereich ausgewählt und gemessen. Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments von insgesamt fünf Experimenten.

Bei Inkubation mit GM-CSF und Interferon- α plus Interleukin-4 beeinflusste Interferon- α die durch Interleukin-4 induzierte Differenzierung der Monozyten zu dendritischen Zellen dagegen nicht. Die Expression an Oberflächenmarkern und auch die morphologischen Veränderungen zeigten nur geringe Unterschiede zu den mit Interleukin-4 generierten dendritischen Zellen. So war die Expression an CD80 gering erhöht (Abb. 4).

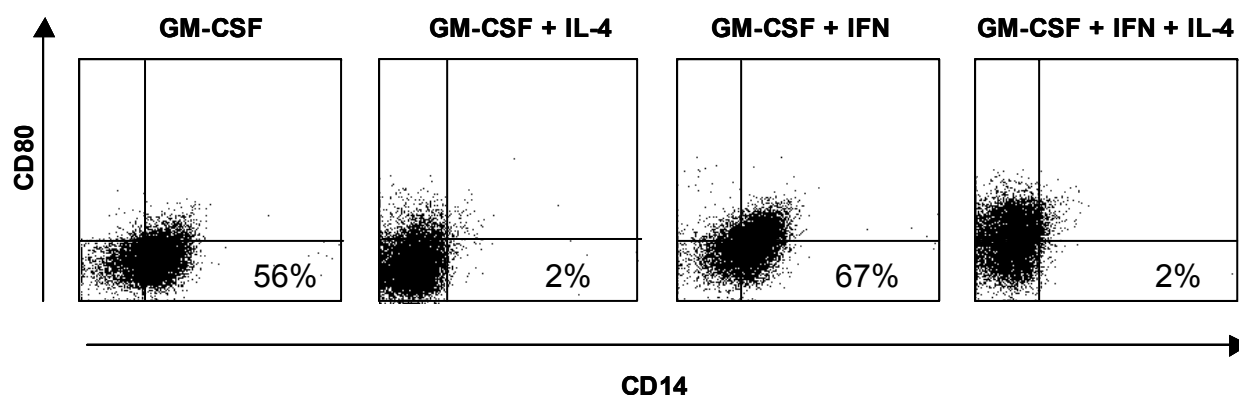


Abbildung 4: Oberflächenmarkerexpression in der FACS-Analyse nach sechs Tagen Kultur der Monozyten mit GM-CSF, mit GM-CSF und Interleukin-4, mit GM-CSF und Interferon- α und mit GM-CSF und Interferon- α plus Interleukin-4: Die mit GM-CSF und Interferon- α plus Interleukin-4 behandelten Zellen ähneln nach sechstägiger Kultur den nur mit Interleukin-4 inkubierten Zellen. Nach Inkubation nur mit GM-CSF oder mit GM-CSF und Interferon- α weisen die Zellen eine hohe Expression an CD14 positiven Zellen (angegeben in %) auf. Gezeigt ist ein Experiment aus vier repräsentativen Experimenten.

3.2 Vergleich der Pinozytose der Monozyten nach sechstägiger Kultur mit Interferon- α oder Interleukin-4

Potente Antigen-präsentierende Zellen zeichnen sich dadurch aus, Antigene aufnehmen und sie für die Präsentation auf MHC-Molekülen bearbeiten zu können (Sallusto und Lanzavecchia 1994). Um den Einfluss von Interferon- α auf die Entwicklung der Kapazität zur Endozytose zu untersuchen, wurden die Zellen nach Inkubation mit Interferon- α mit den Zellen nach Inkubation mit Interleukin-4 (je plus GM-CSF) hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Mikropinozytose verglichen. Dazu wurden beiden Bedingungen der Fluoreszenzfarbstoff FITC-konjugiertes Dextran am Tag 6 bei 37°C für 30 Minuten zugegeben. Unspezifische Anlagerungen von FITC-Dextran und die Bindung an Mannoserezeptoren auf der Zelloberfläche wurden durch Kontrollbedingungen auf Eis kontrolliert. Im Gegensatz zu den morphologisch feststellbaren Unterschieden waren die Monozyten nach sechstägiger

Inkubation mit Interferon- α ebenso zur Antigenaufnahme fähig wie die Zellen nach Differenzierung mit IL-4. Im Vergleich zu den Kontrollen wiesen beide Bedingungen einen mehr als zehnfachen Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) für FITC auf (Abb. 5).

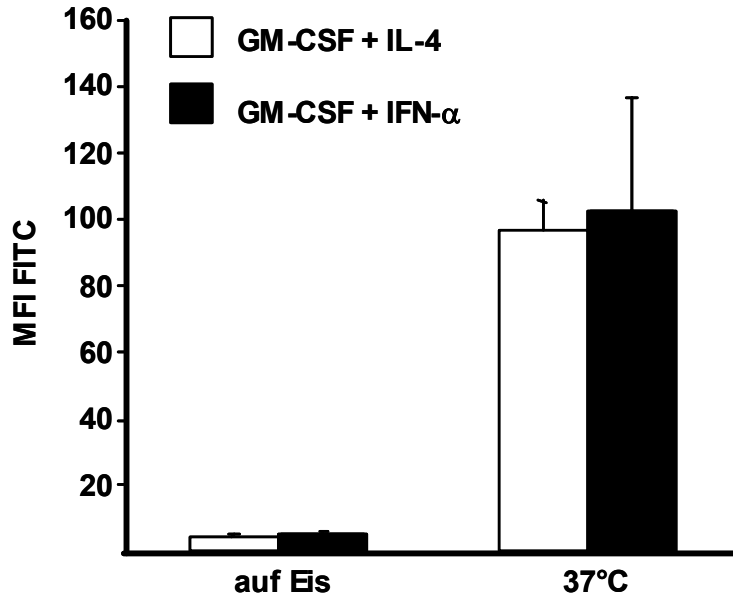


Abbildung 5: Aufnahme von FITC-Dextran durch über sechs Tage mit GM-CSF und Interleukin-4 oder GM-CSF und Interferon- α generierte Zellen: Die mit Interferon- α behandelten Monozyten nehmen lösliches FITC-konjugiertes Dextran nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C in vergleichbarem Maße auf wie nach Inkubation mit Interleukin-4. Als Kontrolle diente ein Ansatz auf Eis. Die Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert, wobei die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) mit dem inkorporierten FITC-Dextran ansteigt. Gezeigt sind die Ergebnisse von n=3 unabhängigen Experimenten \pm SEM.

3.3 Vergleich der Überlebensrate der Monozyten nach sechstägiger Kultur mit Interferon- α oder Interleukin-4

Um das Überleben der mit GM-CSF kultivierten Monozyten nach Inkubation mit Interferon- α oder Interleukin-4 miteinander vergleichen zu können, wurden die beiden Zelltypen jeweils vor (Kontrolle) und nach 48 Stunden Stimulation mit Annexin V-FITC angefärbt und nach einer Inkubationszeit gewaschen. Es folgte die Zugabe von Propidium-Jodid (PI) und unmittelbar danach die durchflusszytometrische Beurteilung. Zur besseren Darstellbarkeit wurden die Messfelder in vier Quadrate eingeteilt. Als nekrotisch oder tot definiert wurden die im oberen äußeren Quadranten detektierten Zellen, die für Annexin V-FITC und PI positiv waren. Unabhängig von der Stimulation und dem Reifegrad der Zellen war das Überleben durch Behandlung mit Interferon- α im Vergleich zu Interleukin-4 nicht reduziert. In beiden Fällen lag der Prozentsatz der nekrotischen Zellen unter 10 % (Abb. 6).

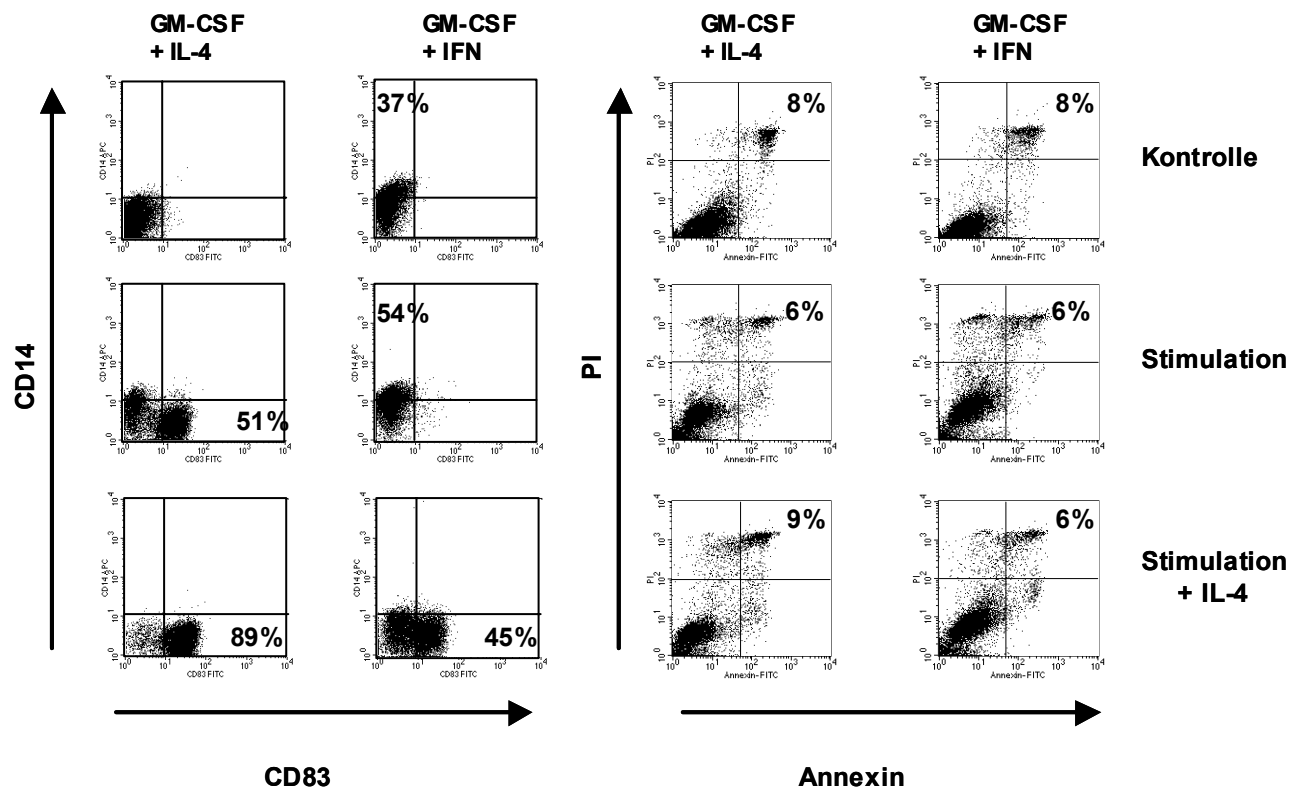


Abbildung 6: Überleben der dendritischen Zellen vor und nach Stimulation sowie Expression der Oberflächenmarker CD14 und CD83: Interferon- α reduziert nicht die Überlebensrate der dendritischen Zellen. Nach Differenzierung mit Interferon- α und nach Inkubation mit Interleukin-4 wurden die Zellen durchflusszytometrisch nach Färbung mit Annexin V-FITC und PI analysiert. Die doppelt positiven Zellen sind dabei als nekrotisch definiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt vier Experimenten.

3.4 Ausreifung der mit Interferon- α differenzierten Monozyten zu dendritischen Zellen durch Zugabe von Interleukin-4

Nach sechs Tagen Inkubation mit Interleukin-4 oder Interferon- α , jeweils unter Anwesenheit von GM-CSF, wurden die Monozyten geerntet, die jeweiligen Überlebensraten bestimmt und der Reifegrad anhand typischer Oberflächenmarker durchflusszytometrisch eingeschätzt. Anschließend wurden die unreifen dendritischen Zellen über 48 Stunden mit einer Kombination an proinflammatorischen Mediatoren (TNF- α , IL-1 β , IL-6 und PGE₂) stimuliert. Als Kontrollbedingung wurden die Monozyten über sechs Tage nur mit GM-CSF oder mit GM-CSF und Interferon- α plus Interleukin-4 inkubiert, gefolgt von der zweitägigen Stimulation mit den proinflammatorischen Mediatoren.

Bereits mikroskopisch konnten deutliche Unterschiede zwischen den mit Interleukin-4 und Interferon- α inkubierten und anschließend stimulierten dendritischen Zellen nachgewiesen werden. Die mit Interleukin-4 behandelten Zellen zeigten nach Stimulation unter dem Elektronenmikroskop deutliche dendritische Ausläufer. Daneben setzten sie sich durch ihre Größe von den mit Interferon- α inkubierten und stimulierten Zellen ab. Diese hatten nur kurze stumpfe Ausläufer und nicht die für reife Zellen typischen zytoplasmatischen Dendriten und ähnelten damit morphologisch nicht nur in ihrer Größe weiterhin den Monozyten. Dass unter den Standardbedingungen klassische reife dendritische Zellen generiert werden konnten, bestätigte sich auch in der durchflusszytometrischen Messung. Nach 48-stündiger Stimulation mit proinflammatorischen Mediatoren exprimierten sie in einheitlichen Populationen sowohl den Reifemarker CD83, MHC-II als auch die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf ihrer Oberfläche (Abb. 7; Abb. 8). Der für Monozyten typische Oberflächemarker CD14 blieb weitgehend negativ. Dagegen exprimierten die Zellen nach Inkubation mit Interferon- α und anschließender Stimulation mit den proinflammatorischen Mediatoren den Monozytenmarker CD14. Die für reife dendritische Zellen charakteristischen Oberflächenmarker CD83 (Abb. 7) konnten nicht nachgewiesen werden. Auch MHC-II und die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 waren im Vergleich mit den Interleukin-4 generierten dendritischen Zellen in nur geringem Maße nachweisbar (Abb. 8).

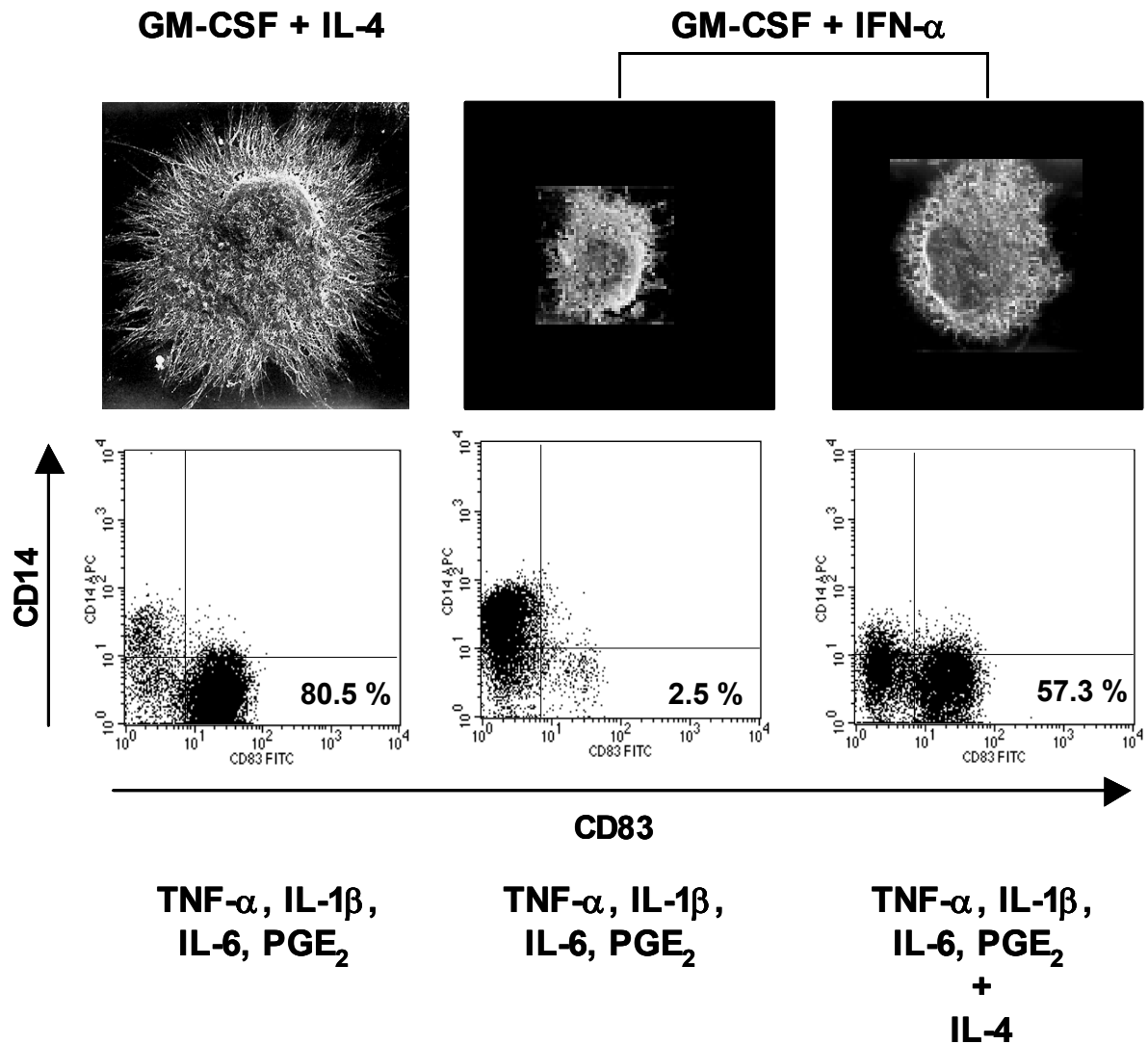


Abbildung 7: Elektronenmikroskopische (1:3200) und FACS-analytische Untersuchung der über sechs Tage mit Interferon- α oder Interleukin-4 inkubierten Zellen nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IL-1 β , IL-6 und PGE₂) und Interleukin-4: Durch zusätzliche Gabe von Interleukin-4 während der Ausreifung entwickeln die mit Interferon- α behandelten Monozyten dendritische Zellcharakteristika. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt fünf unabhängigen Experimenten.

Die Kontrollbedingung mit GM-CSF alleine zeichnete sich ebenfalls durch einen monozytischen Phänotypen aus. Auch hier wurde CD14 nicht herunterreguliert. Es konnte nur eine geringe Expression an CD83, CD86 und an MHC-II nachgewiesen werden (Abb. 8).

Die Anwesenheit von Interferon- α während der Sechs-Tage-Kultur mit GM-CSF und Interleukin-4 hatte keine Auswirkungen auf die Differenzierung der Monozyten zu dendritischen Zellen. Auch unter dieser Bedingung bewirkte die Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen eine Ausreifung mit Expression der typischen Oberflächenmoleküle (Abb. 8).

Von Interleukin-4 ist bekannt, dass es die Differenzierung der GM-CSF-kultivierten Monozyten zu Makrophagen hemmt. Daher wurde der Einfluss von Interleukin-4 auf die Expression der Oberflächenmarker analysiert, wenn es während der Stimulation sowohl zu den mit Interleukin-4 inkubierten als auch mit Interferon- α behandelten Zellen dazugegeben wurde. Bei den unter Standardbedingungen inkubierten dendritischen Zellen hatte die zusätzliche Gabe von 500 U/ml Interleukin-4 während des Stimulationsschrittes keine Auswirkungen: die Expression an CD86, CD80, MHC II und CD83 konnte bereits ohne Anwesenheit während der Stimulation von Interleukin-4 detektiert werden (Abb. 8). Bei den mit Interferon- α inkubierten Zellen konnte dagegen eine rasche Ausreifung zu dendritischen Zellen beobachtet werden: die Mehrheit der Zellen exprimierte innerhalb von 48 Stunden den Reifemarker CD83, kostimulatorische Moleküle und das für die Antigenpräsentation wichtige MHC-II Molekül. Der Monozytenmarker CD14 wurde rasch herunterreguliert (Abb. 7 und 8).

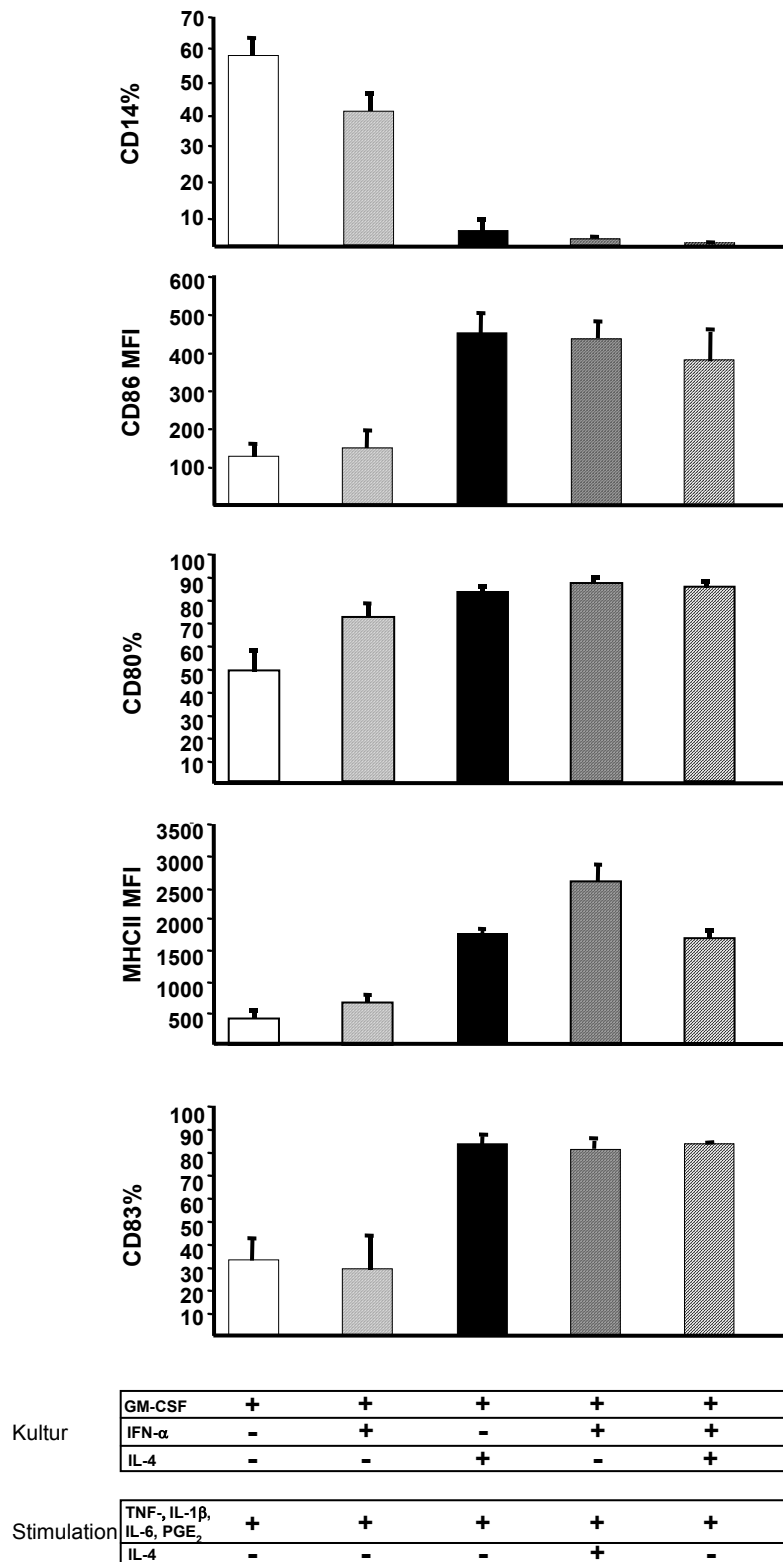


Abbildung 8: Expression der Oberflächenmarker in der FACS Analyse nach 48-stündiger Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen in An- und Abwesenheit von Interleukin-4: Nach Kultur mit GM-CSF und mit GM-CSF und Interferon- α über sechs Tage und anschließender Stimulation zeigten die Zellen einen monozytenähnlichen Phänotypen. Die Anwesenheit von Interferon- α während der Inkubation der Monozyten mit GM-CSF plus Interleukin-4 beeinflusste die Differenzierung zu dendritischen Zellen dagegen nicht. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=3 unabhängigen Experimenten.

Die Konzentration von 500 U/ml an rekombinanten Interferon- α ergab sich aus Dosis-Wirkungsuntersuchungen, wobei sich bis auf eine gering erhöhte Expression an CD86 und MHC-II keine wesentlich bessere Ausreifung der Monozyten zu dendritischen Zellen durch die höhere Konzentration (1000 U/ml) an Interferon- α zeigte. Die geringere Konzentration mit 250 U/ml führte zwar zu ähnlichen Ergebnissen, aber zum Zwecke der Vergleichbarkeit mit anderen experimentellen Arbeiten, die Interferon zumeist in einer Konzentration von 500 U/ml verwendeten, wurde es auch in dieser Arbeit so eingesetzt (Abb. 9).

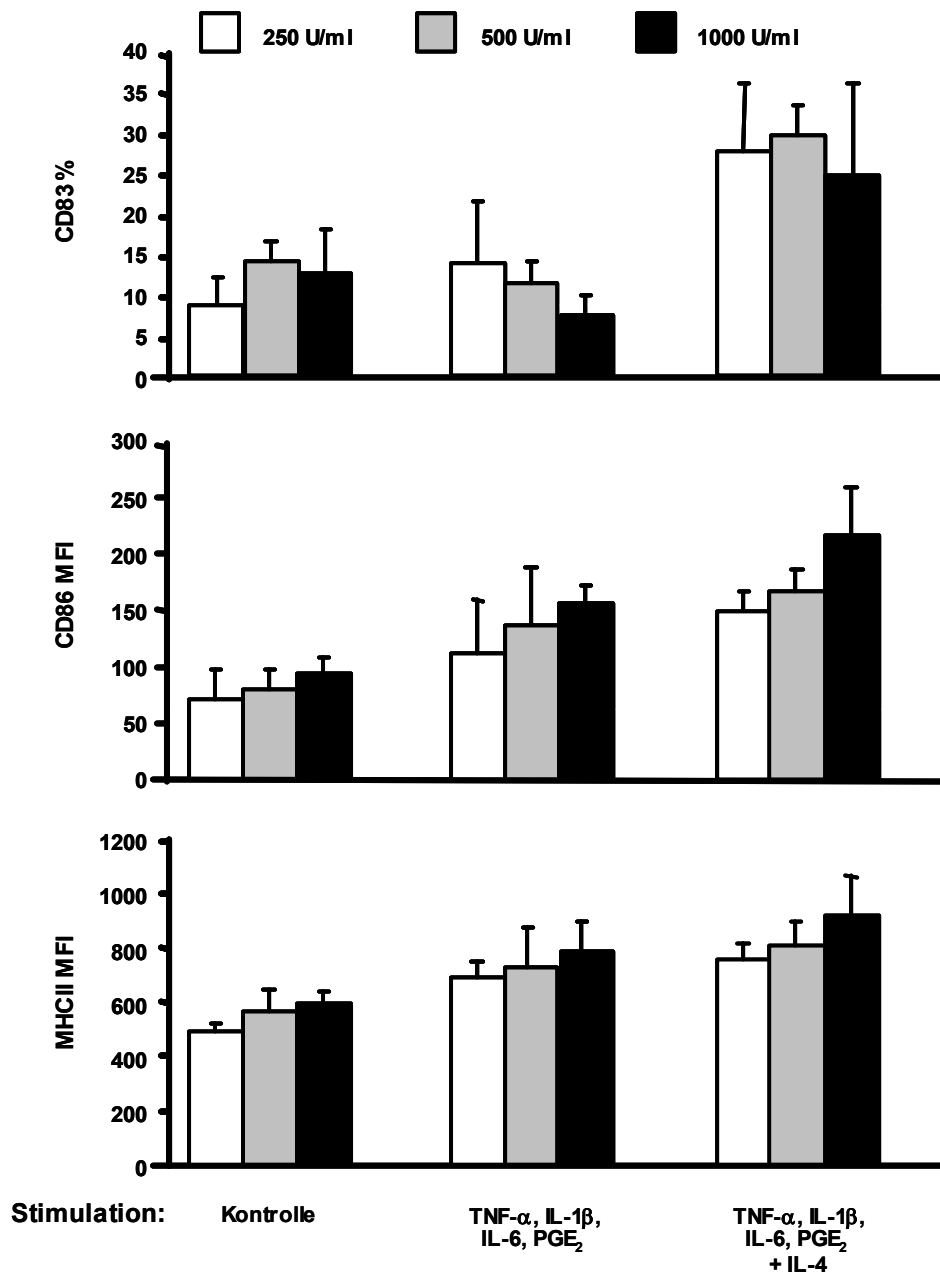


Abbildung 9: Inkubation der Monozyten über sechs Tage mit GM-CSF und Interferon- α in einer Konzentration von 250 U/ml, 500 U/ml und 1000 U/ml und anschließender Stimulation mit proinflammatorischen Mediatoren mit und ohne Interleukin-4. Gezeigt sind Mittelwerte aus n=3 unabhängigen Experimenten \pm SEM.

3.5 Stärkere Expression des Chemokinrezeptors CCR 7 durch Zugabe von Interleukin-4

Um nach Stimulation zu den sekundären Lymphorganen über Lymphgefäße zu wandern, verändern die dendritischen Zellen ihre Expression an Chemokinrezeptoren. In der Peripherie exprimieren unreife dendritische Zellen einige für sie typische Chemokinrezeptoren wie CCR 2, CCR 3, CCR 4 und CCR 6. Diese Chemokinrezeptoren haben entsprechende Liganden auf Oberflächen anderer Zelltypen, was die Interaktion zwischen diesen Zellen erlaubt. Die Stimulation der unreifen dendritischen Zellen ist entscheidend für die Veränderung der Expression an Chemokinrezeptoren. Die genannten Chemokinrezeptoren sind nicht mehr auf der Oberfläche der stimulierten Zellen nachweisbar, der Chemokinrezeptor CCR 7 übernimmt nun eine entscheidende Rolle (Sozzani et al. 2000). Die Chemokine MIP-3 β und SLC werden für die Migration der reifenden dendritischen Zellen zu den Lymphgefäßen und weiter zu den Lymphknoten verantwortlich gemacht. Vergleicht man nun die Expression von CCR 7 der mit proinflammatorischen Mediatoren stimulierten Zellen nach Inkubation mit Interferon- α mit den mit Interleukin-4 inkubierten Zellen, so fällt erneut ein deutlicher Unterschied auf: während es bei den unter Standardbedingungen entstandenen dendritischen Zellen zu einer deutlichen Zunahme der Expression von CCR 7 kommt, benötigen die mit Interferon- α generierten Zellen die zusätzliche Gabe von Interleukin-4 während der Stimulation. Dennoch kann auch mit diesem zusätzlichen Stimulationsfaktor keine vergleichbare Expression bewirkt werden: nur ein Anteil von 19 Prozent weist CCR 7 auf im Vergleich zu 64 Prozent bei Inkubation mit GM-CSF und Interleukin-4 (Abb. 10).

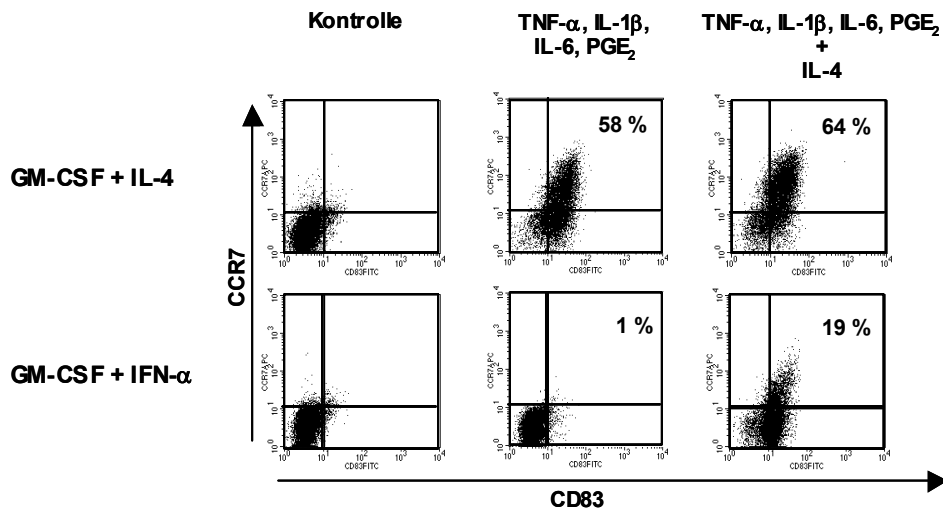


Abbildung 10: Expression des Chemokinrezeptors CCR 7 als Indikator der Migrationsfähigkeit dendritischer Zellen: Mit Interferon- α behandelte Zellen zeigen in der FACS-Analyse auch nach Stimulation mit TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE₂ und zusätzlicher Gabe von Interleukin-4 nur eine geringe Expression des Chemokinrezeptors CCR 7. Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes von insgesamt vier unabhängigen Experimenten.

3.6 Ausreifung dendritischer Zellen innerhalb von nur 24 Stunden durch Zugabe von Interleukin-4

Es stellte sich die Frage, ob Interleukin-4 nur in Zusammenhang mit der Stimulation eine Ausreifung der Zellen bewirkte, die über 6 Tage mit GM-CSF und Interferon- α inkubiert worden waren, oder ob der Effekt auch durch Zugabe des Zytokins an einem anderen Zeitpunkt der Kultur erreicht werden konnte. Aus diesem Grund wurde Interleukin-4 bereits am Tag 5 für nur 24 Stunden in die Kultur zu GM-CSF und Interferon- α gegeben. Diese Zellen wurden anschließend gewaschen und mit proinflammatorischen Mediatoren über 48 Stunden stimuliert. Interessanterweise konnte der beschriebene Effekt von Interleukin-4 auch unter diesen Bedingungen festgestellt werden. Wie in Abbildung 11 ersichtlich, bewirkte die Zugabe von Interleukin-4 am Tag 5 über 24 Stunden mit anschließender Stimulation eine Ausreifung der Zellen. Der Monozytenmarker CD14 wurde in vergleichbarem Maße herunterreguliert wie nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen unter Zugabe von Interleukin-4, die Zellen exprimierten ebenfalls CD86 und den Reifemarker CD83 in über 50 Prozent und die Produktion von Interleukin-12 konnte sogar unter dieser Bedingung noch gesteigert werden. Interleukin-4 wirkt daher nicht als Stimulus, sondern kann die Plastizität der dendritischen Zellen wiederherstellen.

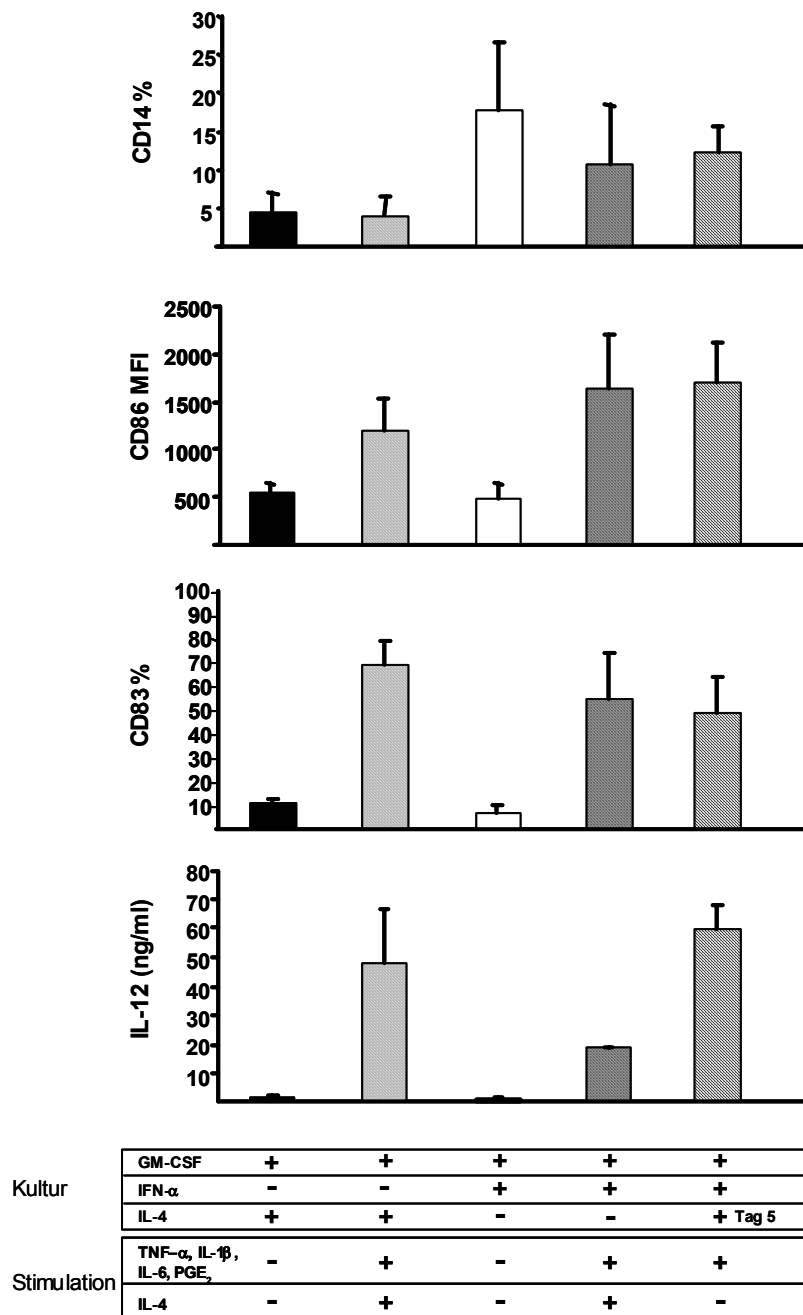


Abbildung 11: Expression der Oberflächenmarker und Produktion von Interleukin-12 nach sechs Tagen Kultur und Zugabe von Interleukin-4 am Tag 5 der Kultur über 24 Stunden mit anschließender Stimulation über 48 Stunden: Interleukin-4 bewirkt bei Zugabe zu der Kultur der Monozyten mit GM-CSF und Interferon- α am Tag 5 über 24 Stunden mit anschließender Stimulation mit proinflammatorischen Mediatoren ebenso eine Ausreifung zu dendritischen Zellen wie bei Anwesenheit während der Stimulation über 48 Stunden. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=3 unabhängigen Experimenten.

3.7 Eingeschränkte Kapazität zur Stimulation von T-Zellen auf der mit Interferon- α behandelten dendritischen Zellen

Die herausragende physiologische Bedeutung dendritischer Zellen besteht in der Induktion einer antigenspezifischen T-Zell-Antwort. Zunächst wurde die Fähigkeit der unterschiedlich abgeleiteten antigenpräsentierenden Zellen untersucht, allogene T-Zellen zu stimulieren. Die über sechs Tage mit GM-CSF und Interleukin-4 oder mit GM-CSF und Interferon- α inkubierten Zellen wurden mit proinflammatorischen Mediatoren mit oder ohne Interleukin-4 über 24 Stunden stimuliert. Es folgte eine Kokultur über fünf Tage mit einer nichtadhärenten Fraktion allogener MNC. Nach 5 Tagen Kokultur wurden die Zellen mit [3 H]-Thymidin gepulst und nach 48 Stunden geerntet, um die Proliferation zu messen.

In der allogenen MLR erwiesen sich die mit Interferon- α inkubierten und mit proinflammatorischen Zytokinen aktivierten Zellen als schwache Stimulatoren einer T-Zell-Proliferation, verglichen mit den mit Interleukin-4 generierten dendritischen Zellen. Unabhängig von dem Verhältnis der dendritischen Zellen zu den T-Zellen konnte keine Proliferation verifiziert werden. Jedoch konnten die mit Interferon- α generierten Zellen bei Anwesenheit von Interleukin-4 während der Stimulation eine T-Zell-Proliferation induzieren. Dieser Effekt wurde aber nur dann hervorgerufen, wenn die antigenpräsentierenden Zellen mit den T-Zellen in einem Verhältnis von 1 zu 20 kokultiviert wurden. Bereits bei einem Verhältnis von 1 zu 40 sowie bei allen niedrigeren Ratios konnte keine Stimulation der allogeneren T-Zellen nachgewiesen werden. Die unter Standardbedingungen mit GM-CSF und Interleukin-4 inkubierten und mit proinflammatorischen Mediatoren ausgereiften dendritischen Zellen führten bereits bei einem Verhältnis von 1 zu 80 zu einer bemerkbaren T-Zell-Proliferation, die in den weiteren aufgezeigten Verhältnissen noch deutlich gesteigert werden konnte (Abb. 12).

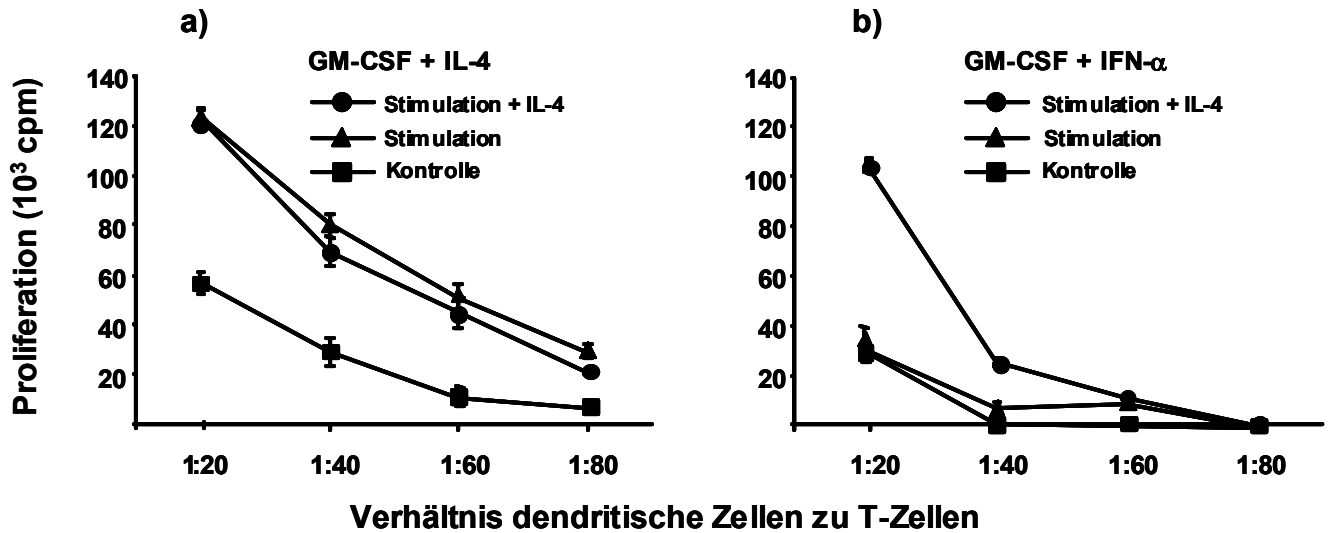


Abbildung 12a und b: Kapazität der dendritischen Zellen zur Stimulation allogener T-Zellen: Nach Inkubation mit Interferon- α und GM-CSF weisen die Zellen eine eingeschränkte Stimulation der allogenen T-Zell-Antwort auf. Nach sechstägiger Kultur mit GM-CSF und Interleukin-4 (Abbildung 12a) oder mit GM-CSF und Interferon- α (Abbildung 12b) wurden die Zellen mit TNF- α , IL-1 β , IL-6 und PGE₂ mit oder ohne Interleukin-4 stimuliert und nach 24 Stunden mit einer nichtadhärenten Fraktion allogener MNC über fünf Tage in Kokultur versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von [³H]-Thymidin, dessen Inkorporation nach 18 Stunden gemessen wurde. Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis von drei Experimenten.

Um die Fähigkeit der unterschiedlich abgeleiteten antigenpräsentierenden Zellen zu untersuchen, autologe T-Zellen antigenspezifisch zu aktivieren, wurde Tetanus-Toxoid (TT) als Modellantigen verwendet. Am Tag 5 der Kultur der Monozyten sowohl mit Interleukin-4 als auch mit Interferon- α wurden die Zellen über 24 Stunden mit TT inkubiert, danach gewaschen und am Tag 6 für 24 Stunden mit den proinflammatorischen Mediatoren plus Interleukin-4 stimuliert. Auf einen Ansatz ohne Interleukin-4 während der Stimulation wurde verzichtet, da für die Induktion der antigenspezifischen T-Zell-Antwort möglichst reife Zellen generiert werden sollten. Anschließend wurden alle Zellen in einer Kultur mit autologen T-Zellen kokultiviert, die mit einem Pan-T-Zell Isolations-Kit aus MNC gewonnen worden waren. Vor dem Ansetzen der Kokultur wurden die Oberflächenmarker der Zellen gemessen. Es zeigten sich nach Inkubation mit und ohne TT bezüglich der Expression von CD14, CD86 und CD83 vergleichbare Ergebnisse (Abb. 13).

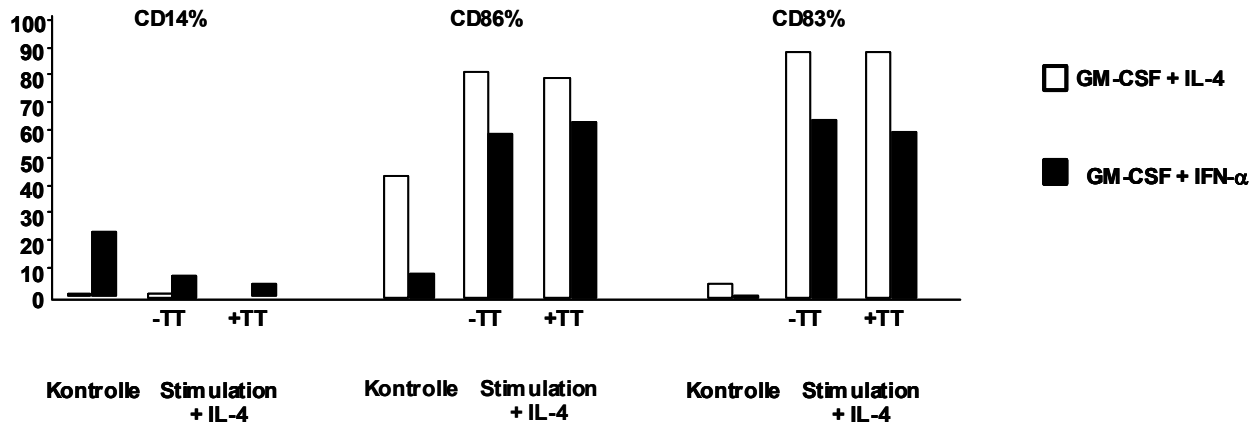


Abbildung 13: Expression der Oberflächenmarker CD14, CD86 und CD83 nach Inkubation mit Tetanus-Toxoid: Es lassen sich keine Unterschiede in der Expression der Oberflächenmarker in An- oder Abwesenheit des Tetanus-Toxoids nachweisen. Gezeigt ist der in Abbildung 14 verwendete Spender vor Einsetzen in die MLR.

Wie auch bei der allogenen T-Zell-Stimulation wurden nach 5 Tagen Kokultur die Zellen mit [³H]-Thymidin gepulst und nach 48 Stunden geerntet, um die Proliferation zu messen. Als Kontrollen dienten dendritische Zellen ohne Antigenbeladung. Diese konnten die autologen T-Zellen nur in geringem Maße stimulieren. Beide Antigen-beladenen und stimulierten Zellpopulationen konnten jedoch T-Zell-Antworten bewirken. Die T-Zell-stimulatorische Kapazität der mit Interferon- α inkubierten Zellen war deutlich geringer (Abb. 14). Eine Antigenabhängigkeit ist aber aufgrund der Kontrollen zu verifizieren.

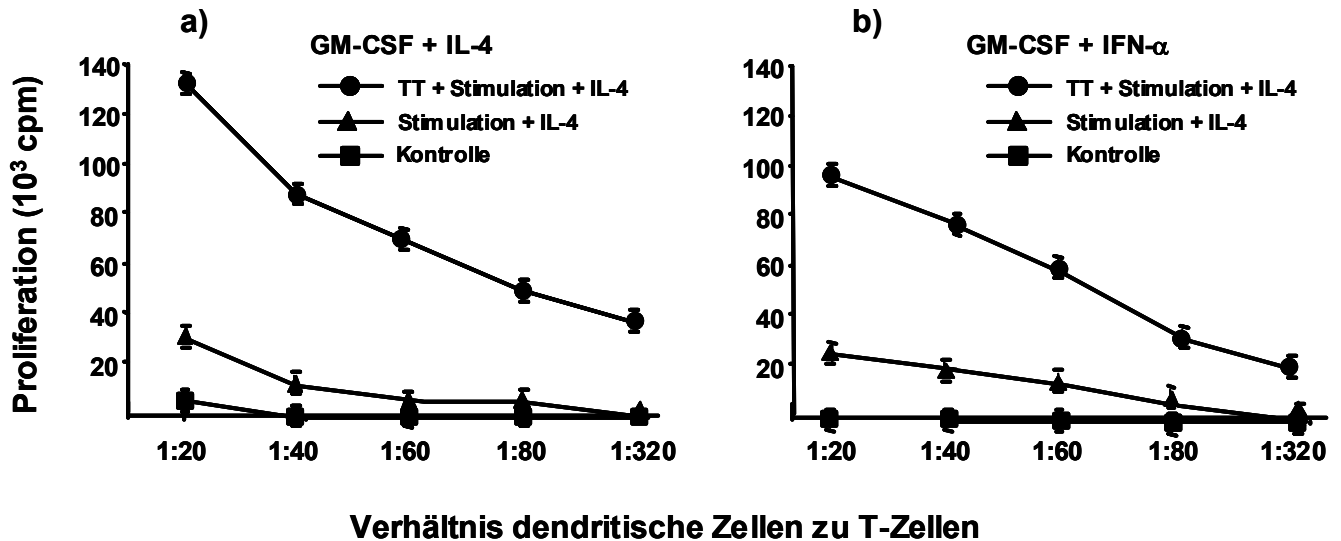


Abbildung 14a und b: Kapazität der dendritischen Zellen zur Stimulation autologer T-Zellen: Nach Inkubation mit Interferon- α und GM-CSF zeigen die Zellen eine eingeschränkte Kapazität zur Stimulation einer antigenspezifischen autologen T-Zell-Antwort. Nach Kultur über sechs Tage entweder mit Interleukin-4 und GM-CSF (Abbildung 14a) oder Interferon- α und GM-CSF (Abbildung 14b) wurden die beiden Zelltypen am Tag 5 mit 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TT beladen und am sechsten Tag über 24 Stunden mit proinflammatorischen Mediatoren und Interleukin-4 stimuliert. Als Kontrolle dienten dendritische Zellen ohne Antigenbeladung. Anschließend wurde wie bei der allogenen T-Zell-Stimulation verfahren. Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis von zwei Experimenten.

3.8 Vergleich der Zytokinproduktion der beiden Differenzierungsstrategien

Die Zytokinproduktion dendritischer Zellen lässt Aussagen über deren Einfluss auf die Immunantwort zu. Daher wurde die Produktion von Interleukin-12, Interleukin-10 und TNF- α der unterschiedlich abgeleiteten antigenpräsentierenden Zellen untersucht. Dazu wurden die mit GM-CSF und entweder mit Interleukin-4 oder Interferon- α generierten Zellen am Tag 6 für 48 Stunden mit den beschriebenen proinflammatorischen Mediatoren inkubiert. Als weitere Bedingung wurde mit CD40L plus Interferon- γ stimuliert, um ein Th₁-Milieu zu imitieren. Die Überstände am Tag 8 wurden gesammelt und auf ihren Gehalt an Zytokinen mittels ELISA untersucht.

Die mit Interleukin-4 kultivierten dendritischen Zellen sezernierten große Mengen an Interleukin-12 (>10 ng/ml), unabhängig von der Stimulationsbedingung. Die Anwesenheit von Interleukin-4 bei Stimulation über 48 Stunden reduzierte die Interleukin-12-Produktion der mit Interleukin-4 generierten dendritischen Zellen. Maximale Interleukin-12-Sekretion

konnte bei Stimulation mit proinflammatorischen Mediatoren ohne Zugabe von Interleukin-4 gemessen werden. Durch diese Stimulation wurde eine höhere Interleukin-12-Produktion induziert als durch Stimulation mit CD40L und Interferon- γ (Abb. 15a).

Die mit Interferon- α generierten dendritischen Zellen hingegen produzierten mehr Interleukin-10 unabhängig von ihrem Reifestadium. Mehr als 200 pg/ml Interleukin-10 wurden bei dieser Population unter allen Stimulationsbedingungen gemessen (Abb. 15a). Auch unter optimaler Stimulation mit proinflammatorischen Mediatoren und Interleukin-4 für die Expression der typischen Oberflächenmarker und für die Induktion einer T-Zell-Antwort wurde nur eine geringe Menge an Interleukin-12 produziert (Abb. 15a). Die Produktion an Interleukin-10 blieb konstant. Nur bei Aktivierung mit CD40L plus Interferon- γ sezernierten die mit Interferon- α inkubierten Zellen vergleichbar viel Interleukin-12 (Abb. 15a), wobei diese Interleukin-12-Produktion wiederum nicht mit der Expression an Reifemarkern korrelierte (< 15 % CD83+ Zellen; Abb. 15b). Wurde jedoch Interleukin-4 zu der Aktivierung mit CD40L plus Interferon- γ hinzugefügt, verringerte sich die Interleukin-12-Produktion, während die Interleukin-10-Produktion und die Expression von CD83 anstiegen.

Abbildung 15a

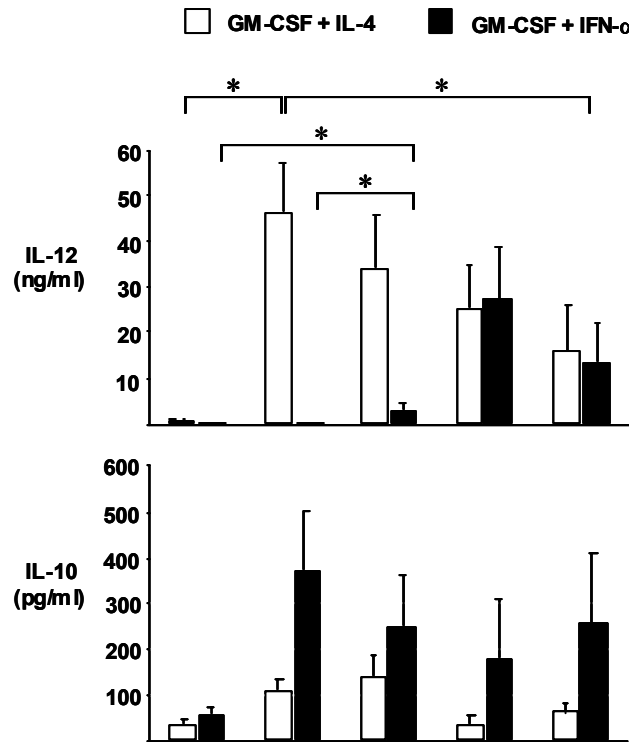


Abbildung 15b

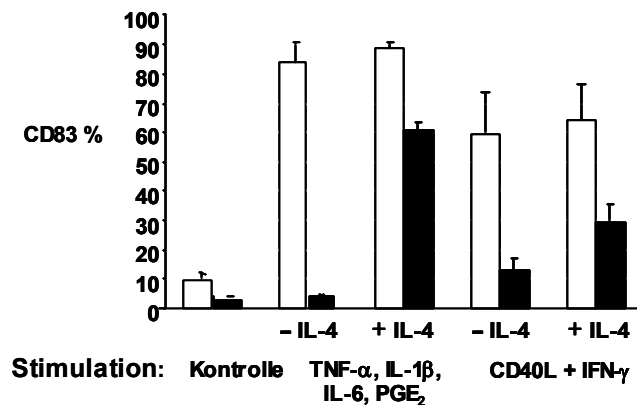


Abbildung 15a: Zytokinproduktion der dendritischen Zellen nach 48-stündiger Stimulation: Mit Interferon- α inkubierte und anschließend stimulierte Monozyten produzierten unabhängig vom Ausreifungsgrad deutlich weniger Interleukin-12 und mehr Interleukin-10 als die mit Interleukin-4 generierten dendritischen Zellen. Die Monozyten-abgeleiteten unreifen Zellen wurden für 48 Stunden mit proinflammatorischen Mediatoren oder mit CD40L und

Interferon- γ stimuliert. Durch Zugabe von Interleukin-4 während der Stimulation wurde dessen Effekt auf die Ausreifung der unterschiedlich generierten Zellen untersucht. Die Überstände der Zellkulturen wurden auf ihren Gehalt an Interleukin-10 und Interleukin-12 mittels ELISA untersucht.

Abbildung 15b: Expression des Oberflächenmarkers CD83 in der FACS Analyse nach 48-stündiger Stimulation mit proinflammatorischen Mediatoren oder CD40L und Interferon- γ in An- und Abwesenheit von Interleukin-4. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM aus n=4 unabhängigen Experimenten.

Um festzustellen, ob die beobachtete geringere Interleukin-12-Produktion abhängig von der autokrinen Interleukin-10-Produktion war, wurde während der Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen ein Interleukin-10-blockierender Antikörper eingesetzt. Dieser beeinflusste jedoch die Interleukin-12 Produktion der mit Interferon- α generierten Zellen nicht und veränderte auch die Expression der DC-typischen Reifemarker nicht (Abb. 16).

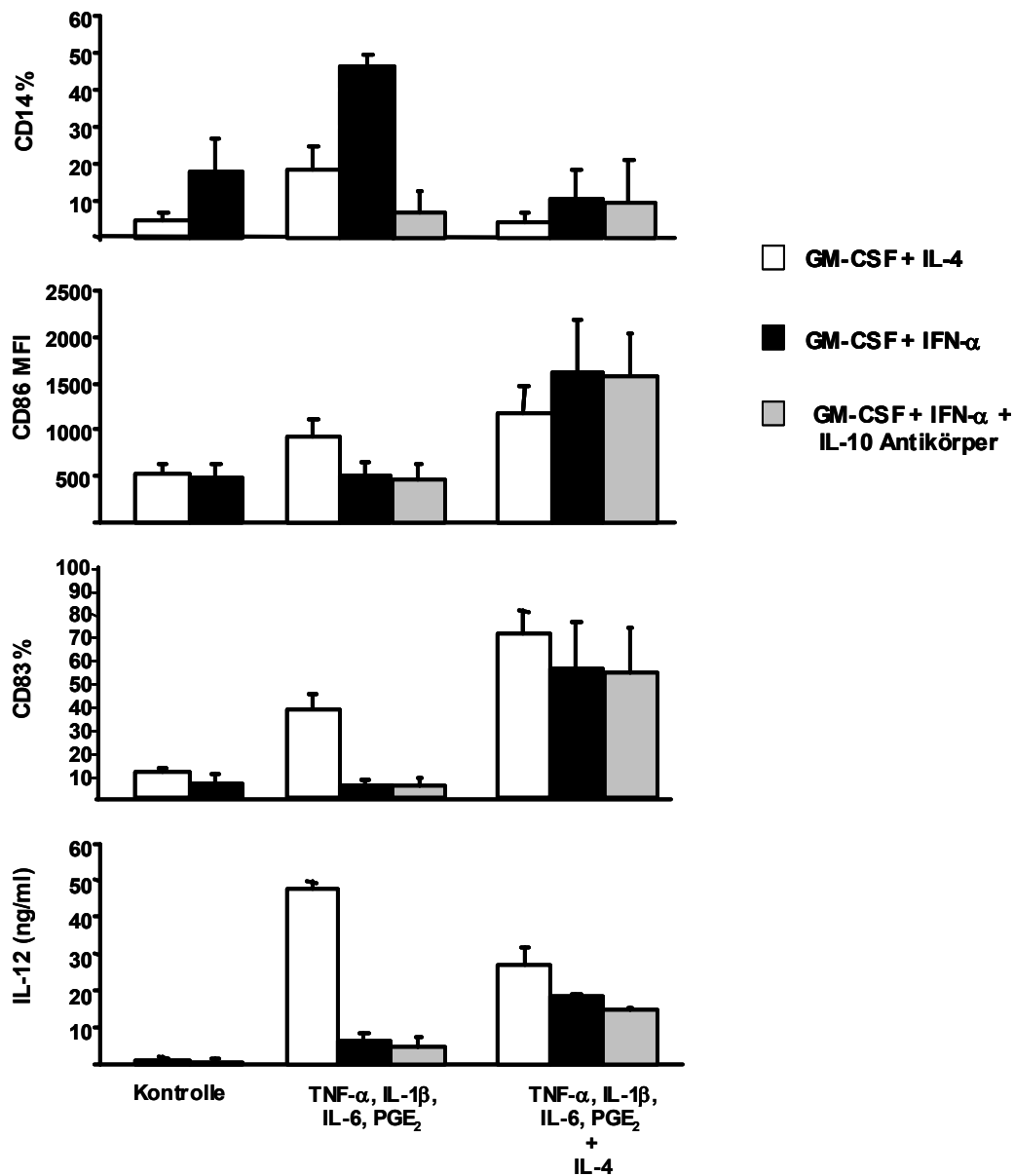


Abbildung 16: Expression der Oberflächenmarker und Zytokinproduktion von Interleukin-12 in Anwesenheit eines Interleukin-10-blockierenden Antikörpers während der Stimulation mit proinflammatorischen Mediatoren: Durch den Antikörper wird die Charakteristik der mit Interferon- α inkubierten Zellen nicht beeinflusst. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM aus n=3 unabhängigen Experimenten.

Während die unstimulierten Zellen kein TNF- α sezernierten, bewirkte sowohl nach Kultur mit Interleukin-4 als auch mit Interferon- α die Stimulation mit proinflammatorischen Mediatoren eine TNF- α Produktion. Die mit Interferon- α generierten Zellen zeigten dabei eine höhere Produktion an TNF- α als die mit Interleukin-4 abgeleiteten dendritischen Zellen. Die Anwesenheit von Interleukin-4 während der Stimulation rief zwar eine phänotypische Ausreifung der Interferon- α -inkubierten Monozyten zu dendritischen Zellen hervor, beeinflusste jedoch nicht die hohe Produktion an TNF- α (Abb. 17).

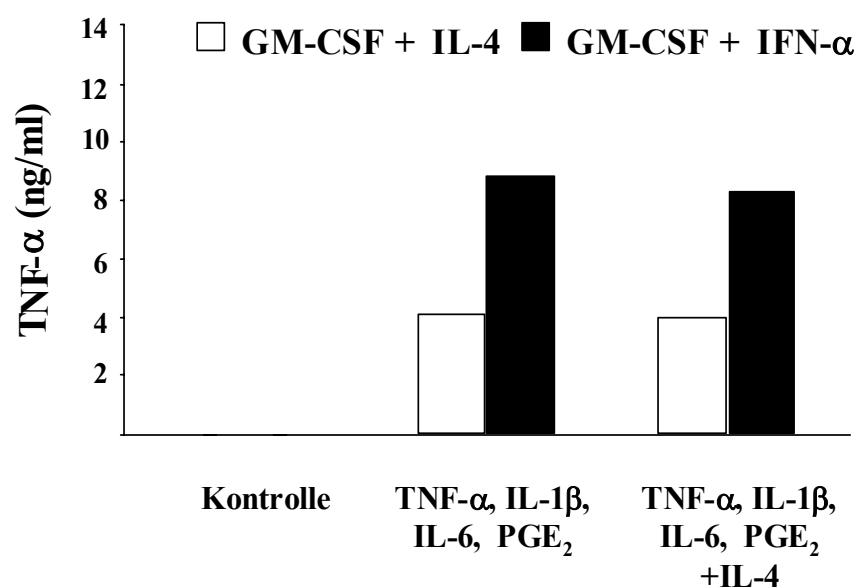


Abbildung 17: Zytokinproduktion der dendritischen Zellen nach 48-stündiger Stimulation: Mit Interferon- α inkubierte und anschließend stimulierte Monozyten produzierten unabhängig des Ausreifungsgrades mehr TNF- α als die mit Interleukin-4 generierten dendritischen Zellen. Die Monozyten-abgeleiteten unreifen Zellen wurden für 48 Stunden mit proinflammatorischen Mediatoren stimuliert. Durch Zugabe von Interleukin-4 während der Stimulation wurde dessen Effekt auf die Ausreifung der unterschiedlich generierten Zellen untersucht. Die Überstände der Zellkulturen wurden auf ihren Gehalt an TNF- α mittels ELISA untersucht. Gezeigt sind Mittelwerte aus n=2 Experimenten unterschiedlicher Spender.

4. Diskussion

4.1 Überblick über die Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Interleukin-4 ein notwendiger Faktor für die Differenzierung dendritischer Zellen aus humanen Monozyten ist, auch wenn diese frühzeitig mit Interferon- α aktiviert werden. Nach Inkubation mit GM-CSF und Interferon- α über sechs Tage behielten Monozyten ihren ursprünglichen Immunphänotyp und ihre Morphologie und konnten auch nach Stimulation mit proinflammatorischen Mediatoren die Proliferation allogener und autologer T-Zellen nur in geringem Maße hervorrufen. Durch Zugabe von Interleukin-4 während der proinflammatorischen Stimulation kam es jedoch zu einer raschen Ausreifung der mit Interferon- α inkubierten Monozyten zu phänotypisch reifen dendritischen Zellen.

Die mit Interferon- α vorbehandelten Zellen waren den mit Interleukin-4 inkubierten dendritischen Zellen in der Induktion der T-Zell-Proliferation deutlich unterlegen. Der bei der Ausreifung zu dendritischen Zellen beschriebene Effekt durch Zugabe von Interleukin-4 während der Stimulation konnte nur bei einem Verhältnis der dendritischen Zellen zu autologen T-Zellen von 1 zu 20 nachgewiesen werden. Dennoch zeigte sich, dass die mit Interferon- α vorbehandelten dendritischen Zellen Antigene aufnehmen und für die Präsentation auf MHC-Molekülen prozessieren können. Bei der allogenen T-Zell-Proliferation konnte eine Antigenabhängigkeit demonstriert werden, unabhängig von der Differenzierungsstrategie der dendritischen Zellen.

Die Produktion von Interleukin-12 konnte nach Inkubation mit Interferon- α nur bei einer Stimulation mit CD40L plus Interferon- γ nachgewiesen werden. Trotz Expression der Reifemarker nach einer Stimulation mit proinflammatorischen Mediatoren plus Interleukin-4 sezernierten die mit Interferon- α vorbehandelten dendritischen Zellen kaum Interleukin-12. Auch der Chemokinrezeptor CCR 7, der für die Wanderung dendritischer Zellen zu den Lymphknoten verantwortlich ist, wurde bei genanntem Differenzierungsweg nur in sehr geringem Maße exprimiert. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass Interferon- α nicht nur die Differenzierung der Monozyten zu dendritischen Zellen, sondern auch die Fähigkeit

der aus Monozyten gewonnenen dendritischen Zellen hemmt, in sekundäre lymphatische Organe zu wandern und dort eine Th₁-Immunantwort hervorzurufen. Interferon- α erweist sich somit nicht als geeigneter Differenzierungsfaktor für dendritische Zellen im Rahmen einer Tumorummuntherapie, da sowohl die Migration als auch die Induktion einer Immunantwort eine unbedingte Voraussetzung für die Wirksamkeit einer solchen Behandlung darstellen.

4.2 Methodendiskussion

4.2.1 Ableitung dendritischer Zellen aus humanen Monozyten durch Zellkulturen

Dendritische Zellen können aus humanem Blut isoliert oder auch aus Nabelschnurblut oder Knochenmark gewonnen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Differenzierungswege zur Ableitung dendritischer Zellen aus humanen Monozyten miteinander verglichen.

Bisher konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, ob ein entsprechender Differenzierungsweg aus Monozyten zu dendritischen Zellen auch unter physiologischen Bedingungen stattfindet. Einige Autoren gehen davon aus, dass nur aus einer bestimmten Fraktion an Monozyten dendritische Zellen entstehen. So stellten sich die CD2⁺ Monozyten nach Inkubation mit GM-CSF und Interleukin-4 als bessere Induktoren einer allogenen T-Zell-Proliferation heraus als CD2⁻ Monozyten oder Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen (Crawford et al. 1999). Bei HIV-infizierten Patienten hingegen fanden sich vermehrt CD14⁺CD16⁺ Monozyten, deren pathophysiologische Rolle genauer untersucht werden sollte. Diese Zellen wurden mit Makrophagen und dendritischen Zellen verglichen, nachdem sie mit GM-CSF, Interleukin-4 und Interleukin-10 inkubiert worden waren. Sie exprimierten für dendritische Zellen typische Oberflächenmarker wie CD40, CD80, CD86 und CD83, produzierten Interleukin-12 und konnten eine autologe T-Zell-Stimulation bewirken. Somit zeigten sie die Charakteristik dendritischer Zellen (Ancuta et al. 2000). Die CD16⁺ Monozyten erwiesen sich zudem als eine Subpopulation, die sich zu dendritischen Zellen entwickelten mit migratorischen Fähigkeiten und längerem Überleben (Randolph et al. 2002). Zuvor hatten Randolph et al. zeigen können, dass Monozyten allein durch transendotheliale Migration zu dendritischen Zellen differenzieren (Randolph et al. 1998).

Einige Argumente sprechen auch für die Differenzierung dendritischer Zellen aus Monozyten als Grundlage für klinische Experimente sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.

Die so gewonnenen Zellen können innerhalb von fünf bis sieben Tagen aus dem peripheren Blut isoliert werden, ohne dass sich die Spender jeglicher Vorbehandlung unterziehen müssen. Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen zeichnen sich daher durch einfache Gewinnung und gute Handhabung aus.

Daneben werden diese Zellen in den meisten klinischen Studien zu Tumorimmuntherapie verwendet (Engleman und Fong 2003, Engleman 2003) und erlauben somit einen Vergleich der jeweiligen Ergebnisse. Die Standardprotokolle sehen eine Inkubation der monozytären oder CD34+ Vorläuferzellen mit GM-CSF als Wachstumsfaktor (Reid et al. 1992) und Interleukin-4 vor (Bender et al. 1996, Romani et al. 1994, 1996, Sallusto und Lanzavecchia 1994, Thurner et al. 1999).

Mit Antigenen beladene dendritische Zellen werden auf dem Gebiet der Tumorerkrankungen und auch der Infektionskrankheiten als Vakzine eingesetzt, um eine antigenspezifische T-Zell-Antwort zu induzieren. Bei den Tumorerkrankungen sind neben B-Zell-Lymphomen die Multiplen Myelome, Prostatakarzinome oder auch Kolorektale Karzinome zu nennen. Zervixkarzinome werden auf Infektionen mit dem Humanen Papilloma Virus (HPV) 16 oder 18 zurückgeführt. Bei Infektion mit diesen Viren wird ebenfalls versucht, eine frühzeitige Therapie durch Vakzinierung mit dendritischen Zellen zu entwickeln (Nonn et al. 2003). Auch bei anderen Viruserkrankungen wie z.B. Epstein-Barr (Ranieri et al. 1999) kommen aus Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen als Vakzine zum Einsatz. Dabei werden die Durchführbarkeit, die Sicherheit und der immunologische und klinische Effekt dieser Therapieansätze untersucht. Die Vakzinierung mit dendritischen Zellen zeigte in ersten klinischen Studien bei Malignompatienten bereits bei einzelnen Patienten vielversprechende Erfolge, indem sie eine tumorspezifische Immunantwort hervorrief und eine Tumorregression bewirkte (Geiger et al. 2001, Nestle et al. 1998, Schuler-Thurner et al. 2002, Timmerman et al. 2002, Murphy et al. 1999, Thurner et al. 1999).

Die in dieser Arbeit unter Standardbedingungen generierten dendritischen Zellen zeigten die phänotypischen und funktionellen Eigenschaften, die auch von anderen Autoren beschrieben wurden. Morphologisch zeichneten sie sich durch die typischen Zytoplasmaausläufer aus und exprimierten in charakteristischem Ausmaß Adhäsionsmoleküle (CD11c, CD54),

kostimulatorische Moleküle (CD80, CD86) und MHC-I sowie MHC-II. Sowohl die mit Interferon- α generierten als auch die mit Interleukin-4 generierten dendritischen Zellen waren zur Endozytose fähig und konnten eine allogene und autologe T-Zell-Proliferation induzieren. Somit entsprachen sie funktionell den *in vivo* beschriebenen gewebständigen unreifen dendritischen Zellen.

4.2.2 Generierung dendritischer Zellen mit Interferon- α

Die Generierung dendritischer Zellen aus Monozyten mit GM-CSF und Interleukin-4 gilt bis heute als Standardmethode. Es wurden jedoch negative Effekte von Interleukin-4 auf bestimmte Funktionen der Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen postuliert (Turner et al. 2001). Typ I-Interferone werden früh in der Immunantwort beispielsweise von PDC oder von virusinfizierten Zellen produziert und könnten die Differenzierung dendritischer Zellen aus monozytären Vorläuferzellen beeinflussen. Als Alternativmethode wurde daher die Generierung dendritischer Zellen mit Interferon- α beschrieben, der aber, nicht zuletzt aufgrund unterschiedlicher experimenteller Ansätze, ebenfalls sowohl positive als auch negative Wirkungen auf die Differenzierung dendritischer Zellen aus Monozyten zugeschrieben werden (siehe 4.3). Ein systematischer Vergleich der Differenzierungsstrategien mit Interferon- α oder Interleukin-4 wurde bisher jedoch nicht durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit können die Aufnahme von FITC-Dextran oder auch die Expression des Chemokinrezeptors CCR 7 nur als indirekte Nachweise der Funktion dendritischer Zellen gedeutet werden. Die Stimulation autologer T-Zellen sowie die Antigenabhängigkeit in der allogenen T-Zell-Proliferation erlauben jedoch Aussagen darüber, dass die mit Interferon- α behandelten und mit Interleukin-4 stimulierten Zellen Eigenschaften dendritischer Zellen aufweisen.

4.2.3 Bestimmung von Zytokinen mittels ELISA

Das Zytokin Interleukin-12 wurde in der vorliegenden Arbeit mittels eines kommerziell verfügbaren ELISA-Kits bestimmt, der nicht nur das biologisch aktive (p70) Heterodimer, sondern auch die (p40) Untereinheit erkennt. Daher muss bei Beurteilung des gemessenen Interleukin-12 dieses Zerfallsprodukt des Dimers berücksichtigt werden, das keinerlei Aussagen über eine Th₁-Induktion ermöglicht. Die Bestimmung des Interleukin-12 p40

Monomers gilt als gängige Methode, weitere Untersuchungen sollten jedoch die Bestimmung des Interleukin-12 (p70) Heterodimers zum Ziel haben.

4.3 Eigene Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur

Die Untersuchung der Differenzierungswege dendritischer Zellen aus menschlichen Monozyten *in vitro* verfolgt zwei Ziele: zum einen soll das Verständnis für die Differenzierung dendritischer Zellen *in vivo* gefördert werden, zum anderen können Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen bei Immuntherapien maligner Erkrankungen zum Einsatz kommen, was bereits Ziel einiger laufender klinischer Untersuchungen ist.

Typ I-Interferone beeinflussen die Funktion antigenpräsentierender Zellen *in vivo* (Jiang und Dhib-Jalbut 1998) und spielen bei der Ausreifung dendritischer Zellen sowohl in der angeborenen als auch erworbenen Immunantwort eine Rolle (Santini et al. 2000, Blanco et al. 2001). Eine beschleunigende Wirkung auf die Differenzierung dendritischer Zellen aus CD34+ Vorgängerzellen und auf die Ausreifung Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen nach Inkubation mit GM-CSF und Interleukin-4 wurde beschrieben (Luft et al. 1998, Huang et al. 2001). Dabei kommt, wie in der vorliegenden Arbeit, Consensus-Interferon zum Einsatz, aber auch Interferon- α 2b und Interferon- β , was bei der Beurteilung einiger der stark voneinander abweichenden Ergebnisse berücksichtigt werden sollte.

Interferon- α ruft bei Huang et al. eine vermehrte Produktion von Interleukin-10 hervor, so dass die Autoren davon ausgehen, dass mit Interferon- α generierte dendritische Zellen die Th₂-Immunantwort stärken und somit zu den dendritischen Zellen vom Typ 2 zählen (Huang et al. 2001). Dendritische Zellen vom Typ 1 produzieren Interleukin-12 und führen zu einer Th₁-Antwort, die durch Sekretion von Interferon- γ und Interleukin-2 gekennzeichnet ist und eine Generierung zytotoxischer T-Lymphozyten sowie eine Aktivierung von Makrophagen und von natürlichen Killerzellen bewirkt. Diese Zellen werden vermehrt in der Therapie maligner Erkrankungen eingesetzt (Hsu et al. 1996, Thurner et al. 1999).

Laut Santini et al. ruft die Inkubation von Monozyten mit GM-CSF und Interferon Typ I bereits nach drei Tagen Zellkultur ohne weitere Stimulation eine Ausreifung dendritischer Zellen hervor (Santini et al. 2000). Die so generierten dendritischen Zellen produzieren zudem Interleukin-15, das T-Zellen anlockt (Wilkinson und Liew 1995) und einen weiteren

Stimulationsfaktor für die Ausreifung dendritischer Zellen darstellt (Mattei et al. 2001). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit beschreiben Santini et al. eine erhöhte Apoptoserate der mit Interferon- α inkubierten Zellen nach sechs Tagen Kultur mit GM-CSF im Vergleich mit Interleukin-4. Die mit Interferon- α generierten Zellen tragen bereits nach drei Tagen den Chemokinrezeptor CCR 7 und wandern auf dessen Liganden MIP-3 β (Parlato et al. 2001, Sallusto et al. 1998). Allerdings exprimiert nur eine Minderheit der Monozyten die Reifemarker dendritischer Zellen nach diesen drei Tagen in Kultur mit GM-CSF und Typ I-Interferon. Darüber hinaus können diese mit Interferon- α behandelten dendritischen Zellen im Vergleich zu Monozyten, die drei Tage mit GM-CSF und Interleukin-4 generiert worden waren, keine Proliferation der T-Zellen hervorrufen. Diese Ergebnisse zeigen auch nicht, dass die über drei Tage mit Interferon- α inkubierten Zellen eine genauso effiziente Th₁- und somit tumorspezifische Immunantwort induzieren wie die Standardzellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass Interleukin-4 für die Differenzierung aus Interferon-behandelten Monozyten zu phänotypisch und morphologisch reifen dendritischen Zellen notwendig ist. Ohne zusätzliche Gabe von Interleukin-4 bewirkt die Inkubation mit Interferon- α keine Entwicklung dendritischer Zellen, sondern die Beibehaltung einer homologen Population an Zellen, die morphologisch und immunphänotypisch Monozyten und Makrophagen ähnlich sind. Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Veröffentlichungen überein, die Interferon ebenfalls keine entscheidende Rolle in der Differenzierung dendritischer Zellen aus Monozyten zuschreiben. Bei Inkubation von Monozyten mit GM-CSF und Interleukin-4 hemmte die Anwesenheit von Interferon- α noch dazu die Differenzierung zu dendritischen Zellen und verminderte die Überlebensrate (McRae et al. 2000, Lehner et al. 2001). Während bereits zuvor eine Abnahme der Anzahl der aus Monozyten-generierten dendritischen Zellen durch Interferon- α beschrieben wurde (Wang et al. 1999), gehen Greenberg und Mosny sogar von einem zytotoxischen Effekt der Typ I-Interferone auf Stammzellen aus (1977). Die erhöhte Apoptosetendenz konnte in der vorliegenden Arbeit, unabhängig von der Stimulationsbedingung, nicht bestätigt werden. Eine mögliche Ursache kann in dem Unterschied der verwendeten Interferone und deren Konzentrationen gesehen werden.

Erstmals konnte eine äußerst schnelle Ausreifung der mit Interferon- α inkubierten Monozyten zu reifen dendritischen Zellen nach Zugabe von Interleukin-4 nachgewiesen werden. Nach 48

Stunden Stimulation mit proinflammatorischen Mediatoren (Feuerstein et al. 2000, Luft et al. 2002) konnten Morphologie und Phänotyp nicht verändert werden. Nach Zugabe von Interleukin-4 genügte hingegen eine Aktivierung von nur 24 Stunden, um die Monozyten nach Kultivierung mit Interferon- α zu dendritischen Zellen zu differenzieren.

Eine ähnlich schnelle Ausreifung von Monozyten zu dendritischen Zellen wurde von Randolph et al. beschrieben, die in der transendothelialen Migration einen Differenzierungsweg von Monozyten zu dendritischen Zellen *in vivo* sehen. Monozyten, die Partikel in der subendothelialen Matrix phagozitierten, entwickelten sich innerhalb von zwei Tagen zu dendritischen Zellen und wanderten in luminaler Richtung. Monozyten, die subendothelial verblieben, zeigten keine Charakteristika dendritischer Zellen, sondern wurden zu Makrophagen (Randolph et al. 1998) umgewandelt. Innerhalb von 20 Stunden konnten mononukleäre Zellen myeloiden Ursprungs durch Zugabe von Calcium-Ionophor zu dendritischen Zellen ausreifen (Czerniecki et al. 1997). Diese Arbeiten untermauern die Hypothese, dass *in vivo* eine rasche Differenzierung von dendritischen Zellen aus Monozyten erfolgen kann.

Nach sechstägiger Inkubation der Monozyten mit Interferon- α ähnelten die Zellen den Monozyten und Makrophagen bezüglich ihres Phänotyps und der sezernierten Zytokine. Die Interferon-inkubierten Zellen produzierten unabhängig von Stimulation und Grad der Ausreifung vorwiegend Interleukin-10 und TNF- α . Bereits bekannt ist, dass humane mit Interferon- α behandelte Monozyten auf bakterielle Superantigene mit einer Sekretion von Interleukin-10 reagieren (Hermann et al. 1998) und Typ I-Interferone in humanen peripheren mononukleären Zellen die Interleukin-12-Produktion in Abhängigkeit von Interleukin-10 hemmen (Wang et al. 2000). Auch die autokrine Produktion von Interleukin-10 verhindert eine spontane Ausreifung Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen und reduziert nach Stimulation mit LPS oder CD40L die Interleukin-12-Produktion (Corinti et al. 2001). Endogen nach Stimulation produziertes Interleukin-10 lässt daher eine hemmende Wirkung auf die Ausreifung dendritischer Zellen und auf die Interleukin-12-Produktion vermuten. Ein direkter Zusammenhang zwischen Interleukin-10 und sowohl der fehlenden Interleukin-12-Sekretion als auch der fehlenden Ausreifung zu dendritischen Zellen konnte jedoch nicht festgestellt werden. Daher liegt ein direkter Einfluss des Interferon- α auf die Entwicklungsplastizität der Monozyten nahe. Lehner et al. erklären dies durch eine erhöhte

Apoptoserate der dendritischen Zellen nach Inkubation mit Typ I-Interferon, die in der vorliegenden Arbeit aber nicht nachweisbar war (Lehner et al. 2001).

Interleukin-4 hatte nicht nur auf den Phänotyp der mit Interferon-inkubierten Monozyten einen Einfluss, sondern auch auf die Produktion an Zytokinen. In Anwesenheit von Interleukin-4 wiesen die Zellen nach Stimulation mit proinflammatorischen Mediatoren nicht nur die typischen Reifemarker dendritischer Zellen auf, sondern reduzierten auch ihre Interleukin-10-Produktion, während geringe Mengen an Interleukin-12 gemessen werden konnten. Die Fähigkeit der mit Interferon-behandelten Monozyten, die für dendritische Zellen typischen Zytokine als Antwort auf proinflammatorische Zytokine zu sezernieren, kann daher auf Interleukin-4 zurückgeführt werden.

Bei Stimulation mit Th₁-typischen Signalen wie CD40L oder Interferon- γ sezernierten die mit Interferon- α behandelten Monozyten zwar Interleukin-12, behielten aber den Phänotyp aktivierter Makrophagen bei (Kato et al. 1996). Dies könnte im Rahmen des T-Helfer-Modells als Th₁-Feedbackmechanismus angesehen werden. Interleukin-4 bewirkte zwar bei etwa 30 Prozent dieser Zellpopulation eine phänotypische Ausreifung zu dendritischen Zellen, verminderte jedoch die Interleukin-12-Produktion und führte zu einem Anstieg der Interleukin-10-Sekretion, was somit eher für eine Th₂-Immunantwort sprechen würde.

In Abwesenheit von Interferon- α weisen die Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen nach Inkubation mit Interleukin-4 und Stimulation mit CD40L und Interferon- γ die höchste Produktion an Interleukin-12 auf (Hochrein et al. 2000). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass das Zytokinmilieu, das während der Entwicklung antigenpräsentierender Zellen anwesend ist, von der Stimulation mit inflammatorischen oder T-Zell-abgeleiteten Signalen abhängt. In Anwesenheit von Interleukin-4 kann sich jedoch nach Ausreifung der antigenpräsentierenden Zellen das Zytokinprofil wieder verändern.

4.4 Klinische Relevanz

Dendritische Zellen spielen als hocheffiziente antigenpräsentierende Zellen und potente Induktoren einer zellulären Immunantwort vor allem auf dem Gebiet der Tumor-Immuntherapie eine herausragende Rolle. Sie könnten als zelluläre Tumorstoffe eine wirksame Therapie gegen Malignome bewirken. Tumor-spezifischen Antigene, die durch dendritische Zellen präsentiert werden, können von T-Zellen erkannt werden und stellen somit potentielle Ziele für die Immuntherapie maligner Erkrankungen dar. In einigen Studien konnten dendritische Zellen als Tumorstoffe mit klinisch nur gering nachweisbaren, aber dennoch ermutigenden Effekten eingesetzt werden. Es konnte die Induktion einer gegen den Tumor gerichteten Immunantwort sowie in einigen Fällen auch ein klinisches Ansprechen beobachtet werden (Murphy et al. 1999, Nestle et al. 1998, Thurner et al. 1999). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Interferon- α keine Differenzierung dendritischer Zellen bewirkt, die als potente Initiatoren einer Immunantwort angesehen werden können. Die niedrige CCR 7-Expression gibt indirekt einen Hinweis darauf, dass durch Interferon- α die Migration in sekundäre lymphatische Organe eingeschränkt wird. Dies hätte zur Folge, dass die Tumor-assoziierten Antigene den T-Zellen nicht in ausreichendem Maße präsentiert werden könnten. Zusätzlich ist die Stimulation der T-Zellen nur bei einer großen Anzahl antigenpräsentierender Zellen nachweisbar, was eine zusätzliche Einschränkung der dendritischen Zellen nach Behandlung mit Interferon- α als Tumorstoffe bedeutete. Das Zytokinprofil unterscheidet sich auch deutlich von den unter Standardbedingungen gewonnenen dendritischen Zellen, die als Tumorstoffe bereits eine gegen Tumore gerichtete Immunantwort hervorgerufen haben. Die geringere Interleukin-12-Produktion lässt auf eine verminderte Kapazität einer Th₁-Induktion schließen. Diese Einschränkungen könnten den Einsatz der *in vitro* mit Interferon- α generierten dendritischen Zellen in klinischen Studien zur Immuntherapie bei Tumorerkrankungen limitieren.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von Interferon- α als Differenzierungsfaktor von dendritischen Zellen aus humanen Monozyten im Vergleich mit Interleukin-4 untersucht. Interleukin-4 wird unter heute geltenden Standardbedingungen in der Generierung dendritischer Zellen eingesetzt. Dendritische Zellen nehmen eine zentrale Rolle in der humanen Immunantwort ein und werden in klinischen Studien als Vakzine eingesetzt. Tumorspezifische Antigene, die von dendritischen Zellen präsentiert werden, können von T-Zellen erkannt werden. Dies hat die Induktion einer antigen-spezifischen Immunantwort zur Folge. Hintergrund dieser Arbeit war es, die bisher widersprüchlichen Daten bezüglich der Ableitung dendritischer Zellen aus Monozyten mit Interleukin-4 oder Interferon- α zu ergänzen, einen systematischen Vergleich der beiden Differenzierungsfaktoren zu erstellen und daraus Schlüsse für deren Einsatz in einer Tumorummuntherapie zu ziehen.

Die folgenden Befunde wurden erhoben:

Die Endozytoserate humaner Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen war sowohl nach Inkubation mit Interleukin-4 als auch mit Interferon- α vergleichbar. Nach Antigenaufnahme waren beide Zellpopulationen zur Induktion einer T-Zellproliferation fähig. Interferon- α behindert somit nicht die Kapazität zur Aufnahme und Prozessierung der Antigene.

Nach Inkubation mit Interleukin-4 und nach Stimulation mit proinflammatorischen Mediatoren und auch Th₁-spezifischen Signalen entwickelten die Monozyten einen für ausgereifte dendritische Zellen typischen Phänotyp mit Expression von kostimulatorischen Molekülen, Reifemarkern, Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren. Im Gegensatz dazu bewahrten die mit Interferon- α behandelten Monozyten unabhängig von der Stimulationsbedingung einen Monozyten/Makrophagen-ähnlichen Phänotypen. In Anwesenheit von Interleukin-4 während der Stimulationsphase reiften auch diese Zellen rasch zu dendritischen Zellen heran und exprimierten ebenfalls die klassischen Oberflächenmarker potenter antigenpräsentierender Zellen. Interleukin-4 ist somit ein notwendiger Faktor für die Differenzierung der mit Interferon- α aus Monozyten abgeleiteten dendritischen Zellen.

Nach Differenzierung mit Interleukin-4 sezernierten die dendritischen Zellen Interleukin-12, während nach Behandlung mit Interferon- α kein Interleukin-12 detektiert werden konnte. Wurden die Monozyten über sechs Tage mit GM-CSF und Interferon- α plus Interleukin-4 inkubiert, so entstanden nach Stimulation zwar phänotypisch reife dendritische Zellen, aber auch hier konnte keine Interleukin-12-Produktion nachgewiesen werden. Somit erweist sich Interferon- α als Induktionsfaktor einer Th₁-Immunantwort als ungeeignet.

In der Interaktion mit allogenen und autologen T-Zellen erwiesen sich die mit Interferon- α vorbehandelten dendritischen Zellen als potente Stimulatoren der T-Zell-Proliferation, wenn sie zusätzlich zu den proinflammatorischen Zytokinen mit Interleukin-4 für 24 bis 48 Stunden inkubiert worden waren.

Mit dieser Arbeit wurde erstmals ein systematischer Vergleich der Funktionen dendritischer Zellen nach Differenzierung mit Interleukin-4 oder zusätzlich Interferon- α gezogen. Dabei entwickelten sich die Interferon- α behandelten Monozyten zunächst zu Monozyten/Makrophagen-ähnlichen Zellen, die auch nach Stimulation die Funktionen ausgereifter dendritischer Zellen nicht erfüllen konnten. Nur in Anwesenheit von Interleukin-4 nach fünf Tagen Inkubation oder während der Stimulation entwickelten die mit Interferon- α generierten Zellen den Phänotypen dendritischer Zellen, waren aber in der Interleukin-12-Produktion und zur Induktion einer primären Immunantwort den Standardzellen unterlegen. In Gegenwart von Interferon- α generierte dendritische Zellen scheinen damit für den Einsatz in der Tumormimmuntherapie nicht geeignet.

6. Literatur

1. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; **383**:787-93.
2. Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, Sauter B, Roy P, Silverstein RL, Bhardwaj N. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1998; **188**:1359-68.
3. Ancuta P, Weiss L, Haeffner-Cavaillon N. CD14+CD16++ cells derived in vitro from peripheral blood monocytes exhibit phenotypic and functional dendritic cell-like characteristics. *Eur J Immunol* 2000; **30**:1872-83.
4. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; **18**:767-811.
5. Bartholome EJ, Willems F, Crusiaux A, Thielemans K, Schandene L, Goldman M. IFN-beta interferes with the differentiation of dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells: selective inhibition of CD40-dependent interleukin-12 secretion. *J Interferon Cytokine Res* 1999; **19**:471-8.
6. Basak SK, Harui A, Stolina M, Sharma S, Mitani K, Dubinett SM, Roth MD. Increased dendritic cell number and function following continuous in vivo infusion of granulocyte macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-4. *Blood* 2002; **99**:2869-79.
7. Belardelli F, Vignaux F, Proietti E, Gresser I. Injection of mice with antibody to interferon renders peritoneal macrophages permissive for vesicular stomatitis virus and encephalomyocarditis virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**:602-6.
8. Belardelli F. Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. *APMIS (Denmark)* 1995; **103**:161-79.

-
9. Bender A, Sapp M, Schuler G, Steinman RM, Bhardwaj N. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J Immunol Methods* 1996; **196**:121-35.
 10. Bernhard H, Disis ML, Heimfeld S, Hand S, Gralow JR, Cheever MA. Generation of immunostimulatory dendritic cells from human CD34+ hematopoietic cells of the bone marrow and peripheral blood. *Cancer Res* 1995; **55**:1099-104.
 11. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999; **17**:189-220.
 12. Blanco P, Palucka AK, Gill M, Pascual V, Banchereau J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science* 2001; **294**:1540-3.
 13. Bogdan C. The function of type I interferons in antimicrobial immunity. *Curr Opin Immunol* 2000; **12**:419-24.
 14. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968; **97**:77-89.
 15. Bullens DM, Kasran A, Thielemans K, Bakkus M, Ceuppens JL. CD40L-induced IL-12 production is further enhanced by the Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *Scand J Immunol (England)* 2001; **53**:455-63.
 16. Byrnes AA, Ma X, Cuomo P, Park K, Wahl L, Wolf SF, Zhou H, Trinchieri G, Karp CL. Type I interferons and IL-12: convergence and cross-regulation among mediators of cellular immunity. *Eur J Immunol* 2001; **31**:2026-34.
 17. Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 1992; **360**:258-61.

-
18. Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells.
Nature 1997; **388**:782-7.
19. Cella M, Facchetti F, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization.
Nat Immunol 2000; **1**:305-10.
20. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon.
Nat Med 1999; **5**:919-23.
21. Cella M, Salio M, Sakakibara Y, Langen H, Julkunen I, Lanzavecchia A. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA.
J Exp Med 1999; **189**:821-9.
22. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation.
J Exp Med 1996; **184**:747-52.
23. Chen X, Regn S, Raffegerst S, Kolb HJ, Roskrow M. Interferon alpha in combination with GM-CSF induces the differentiation of leucaemic antigen-presenting cells that have the capacity to stimulate a specific anti-leucaemic cytotoxic T-cell response from patients with chronic myeloid leucaemia.
Br J Haematol 2000; **111**:596-607.
24. Chomarat P, Banchereau J. An update on interleukin-4 and its receptor.
Eur Cytokine Netw (France) 1997; **8**:333-44.
25. Clark EA, Ledbetter JA. How B and T cells talk to each other.
Nature 1994; **367**:425-8.
26. Corinti S, Albanesi C, la Sala A, Pastore S, Girolomoni G. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions.
J Immunol 2001; **166**:4312-8.
27. Cousens LP, Orange JS, Su HC, Biron CA. Interferon-alpha/beta inhibition of interleukin-12 and interferon-gamma production in vitro and endogenously during viral

infection.

Proc Natl Acad Sci USA 1997; **94**:634-9.

28. Crawford K, Gabuzda D, Pantazopoulos V, Xu J, Clement C, Reinherz E, Alper CA. Circulating CD2⁺ monocytes are dendritic cells.

J Immunol 1999; **163**:5920-8.

29. Czerniecki BJ, Carter C, Rivoltini L, Koski GK, Kim HI, Weng DE, Roros JG, Hijazi YM, Xu S, Rosenberg SA, Cohen PA. Calcium ionophore-treated peripheral blood monocytes and dendritic cells rapidly display characteristics of activated dendritic cells.

J Immunol 1997; **159**:3823-37.

30. D'Andrea A, Ma X, Aste-Amezaga M, Paganin C, Trinchieri G. Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production.

J Exp Med 1995; **181**:537-46.

31. Defrance T, Vanbervliet B, Pene J, Banchereau J. Human recombinant IL-4 induces activated B lymphocytes to produce IgG and IgM.

J Immunol 1988; **141**:2000-5.

32. Diaz MO, Pomykala HM, Bohlander SK, Maltepe E, Malik K, Brownstein B, Olopade OI. Structure of the human type-I interferon gene cluster determined from a YAC clone contig.

Genomics 1994; **22**:540-52.

33. Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait-Yahia S, Briere F, Zlotnik A, Lebecque S, Caux C. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites.

J Exp Med 1998; **188**:373-86.

34. Djeu JY, Heinbaugh JA, Holden HAT, Herberman RB. Augmentation of mouse natural killer cell activity by interferon and interferon inducers.

J Immunol 1979; **122**:175-81.

35. Ebner S, Ratzinger G, Krosbacher B, Schmuth M, Weiss A, Reider D, Kroczeck RA, Herold M, Heufler C, Fritsch P, Romani N. Production of IL-12 by human monocyte-derived dendritic cells is optimal when the stimulus is given at the onset of maturation,

and is further enhanced by IL-4.

J Immunol 2001; **166**:633-41.

36. Eloranta ML, Sandberg K, Ricciardi-Castagnoli P, Lindahl M, Alm GV. Production of interferon-alpha/beta by murine dendritic cell lines stimulated by virus and bacteria.

Scand J Immunol 1997; **46**:235-41.

37. Engleman EG, Fong L. Induction of immunity to tumor-associated antigens following dendritic cell vaccination of cancer patients.

Clin Immunol 2003; **106**:10-5.

38. Engleman EG. Dendritic cell-based cancer immunotherapy.

Semin Oncol 2003; **30**:23-9.

39. Fanger NA, Wardwell K, Shen L, Tedder TF, Guyre PM. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells.

J Immunol 1996; **157**:541-8.

40. Ferbas JJ, Toso JF, Logar AJ, Navratil JS, Rinaldo CR. CD4+ blood dendritic cells are potent producers of IFN-alpha in response to in vitro HIV-1 infection.

J Immunol 1994; **152**:4649-62.

41. Feuerstein B, Berger TG, Maczek C, Roder C, Schreiner D, Hirsch U, Haendle I, Leisgang W, Glaser A, Kuss O, Diepgen TL, Schuler G, Schuler-Thurner B. A method for the production of cryopreserved aliquots of antigen-preloaded, mature dendritic cells ready for clinical use.

J Immunol Methods 2000; **245**:15-29.

42. Flamand V, Sornasse T, Thielemans K, Demanet C, Bakkus M, Bazin H, Tielemans F, Leo O, Urbain J, Moser M. Murine dendritic cells pulsed in vitro with tumor antigen induce tumor resistance in vivo.

Eur J Immunol 1994; **24**:605-10.

43. Geiger JD, Hutchinson RJ, Hohenkirk LF, McKenna EA, Yanik GA, Levine JE, Chang AE, Braun TM, Mule JJ. Vaccination of pediatric solid tumor patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells can expand specific T cells and mediate tumor regression.

Cancer Res 2001; **61**:8513-9.

44. Ghoreschi K, Thomas P, Breit S, Dugas M, Mailhammer R, van Eden W, van der Zee R, Biedermann T, Prinz J, Mack M, Mrowietz U, Christophers E, Schlondorff D,

-
- Plewig G, Sander CA, Rocken M. Interleukin-4 therapy of psoriasis induces Th2 responses and improves human autoimmune disease.
Nat Med 2003; **9**:40-6.
45. Gidon-Jeangirard C, Solito E, Hofmann A, Russo-Marie F, Freyssinet JM, Martinez MC. Annexin V counteracts apoptosis while inducing Ca(2+) influx in human lymphocytic T cells.
Biochem Biophys Res Commun 1999; **265**:709-15.
46. Greenberg PL, Mosny SA. Cytotoxic effects of interferon in vitro on granulocytic progenitor cells.
Cancer Res 1977; **37**:1794-9.
47. Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response.
Blood 1997; **90**:3245-87.
48. Hartmann G, Weiner GJ, Krieg AM. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells.
Proc Natl Acad Sci USA 1999; **96**:9305-10.
49. Henry F, Boisteau O, Bretaudeau L, Lieubeau B, Meflah K, Gregoire M. Antigen-presenting cells that phagocytose apoptotic tumor-derived cells are potent tumor vaccines.
Cancer Res 1999; **59**:3329-32.
50. Hermann P, Rubio M, Nakajima T, Delespesse G, Sarfati M. IFN-alpha priming of human monocytes differentially regulates gram-positive and gram-negative bacteria-induced IL-10 release and selectively enhances IL-12p70, CD80, and MHC class I expression.
J Immunol 1998; **161**:2011-8.
51. Hernberg M, Pyrhonen S, Muhonen T. Regimens with or without interferon-alpha as a treatment for metastatic melanoma and renal cell carcinoma: an overview of randomized trials.
J Immunother 1999; **22**:145-54.
52. Heron I, Berg K. Human leucocyte interferon: analysis of effects on MLC and effector cell generation.
Scand J Immunol 1979; **9**:517-26.

-
53. Hochrein H, O'Keeffe M, Luft T, Vandenabeele S, Grumont RJ, Maraskovsky E, Shortman K. Interleukin (IL)-4 is a major regulatory cytokine governing bioactive IL-12 production by mouse and human dendritic cells.
J Exp Med 2000; **192**:823-33.
54. Hock BD, Starling GC, Daniel PB, Hart DN. Characterization of CMRF-44, a novel monoclonal antibody to an activation antigen expressed by the allostimulatory cells within peripheral blood, including dendritic cells.
Immunology 1994; **83**:573-81.
55. Howard M, Farrar J, Hilfiker M, Johnson B, Takatsu K, Hamaoka T, Paul WE. Identification of a T cell-derived b cell growth factor distinct from interleukin 2.
J Exp Med 1982; **155**:914-23.
56. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engleman EG, Levy R. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells.
Nat Med 1996; **2**:52-8.
57. Huang YM, Hussien Y, Yarilin D, Xiao BG, Liu YJ, Link H. Interferon-beta induces the development of type 2 dendritic cells.
Cytokine 2001; **13**:264-71.
58. Inaba K, Metlay JP, Crowley MT, Steinman RM. Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ.
J Exp Med 1990; **172**:631-40.
59. Inaba K, Steinman RM, Van Voorhis WC, Muramatsu S. Dendritic cells are critical accessory cells for thymus-dependent antibody responses in mouse and in man.
Proc Natl Acad Sci USA 1983; **80**:6041-5.
60. Inaba K, Witmer MD, Steinman RM. Clustering of dendritic cells, helper T lymphocytes, and histocompatible B cells during primary antibody responses in vitro.
J Exp Med 1984; **160**:858-76.
61. Isaacs A, Lindemann J. Virus interference: the interferon.
Proc R Soc London Ser 1957; **B147**:258-267.
62. Ito T, Inaba M, Inaba K, Toki J, Sogo S, Iguchi T, Adachi Y, Yamaguchi K, Amakawa R, Valladeau J, Saeland S, Fukuhara S, Ikehara S. A CD1a⁺/CD11c⁺ subset of

human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells.

J Immunol 1999; **163**:1409-19.

63. Itri LM. The interferons.

Cancer 1992; **70**:940-5.

64. Jabara HH, Fu SM, Geha RS, Vercelli D. CD40 and IgE: synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin-4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B cells.

J Exp Med 1990; **172**:1861-4.

65. Jiang H, Dhib-Jalbut S. Differential induction of IL-12 by IFN-beta and IFN-gamma in human macrophages.

J Interferon Cytokine Res 1998; **18**:697-703.

66. Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM, Nussenzweig MC. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing.

Nature 1995; **375**:151-5.

67. Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, Enk AH. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free condition.

Eur J Immunol 1997; **27**:3135-42.

68. Kadowaki N, Antonenko S, Lau JYN, Liu YJ. Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity.

J Exp Med 2000; **192**:219-26.

69. Kalinski P, Smits HH, Schuitemaker JH, Vieira PL, van Eijk M, de Jong EC, Wierenga EA, Kapsenberg ML. IL-4 is a mediator of IL-12p70 induction by human Th2 cells: reversal of polarized Th2 phenotype by dendritic cells.

J Immunol 2000; **165**:1877-81.

70. Kasahara A, Hayashi N, Hiramatsu N, Oshita M, Hagiwara H, Katayama K, Kato M, Masuzawa M, Yoshihara H, Kishida Y. Ability of prolonged interferon treatment to suppress relapse after cessation of therapy in patients with chronic hepatitis C: a multicenter randomized controlled trial.

Hepatology 1995; **21**:291-7.

-
71. Kato T, Hakamada R, Yamane H, Nariuchi H. Induction of IL-12 p40 messenger RNA expression and IL-12 production of macrophages via CD40-CD40 ligand interaction.
J Immunol 1996; **156**:3932-8.
72. Kay NE, Pittner BT. IL-4 biology: impact on normal and leukemic CLL B cells.
Leuk Lymphoma 2003; **44**:897-903.
73. Kirchner H. Interferons, a group of multiple lymphokines.
Springer Semin Immunopathol 1984; **7**:347-74.
74. Le Bon A, Schiavoni G, D'Agostino G, Gresser I, Belardelli F, Tough DF. Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo.
Immunity 2001; **14**:461-70.
75. Lehner M, Felzmann T, Clodi K, Holter W. Type I interferons in combination with bacterial stimuli induce apoptosis of monocyte-derived dendritic cells.
Blood 2001; **98**:736-42.
76. Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ. cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase.
Cell 1993; **72**:269-78.
77. Lindahl P, Leary P, Gresser I. Enhancement by interferon of the specific cytotoxicity of sensitized lymphocytes.
Proc Natl Acad Sci USA 1972; **69**:721-5.
78. Lindahl-Magnusson P, Leary P, Gresser I. Interferon inhibits DNA synthesis induced in mouse lymphocyte suspensions by phytohaemagglutinin or by allogeneic cells.
Nat New Biol 1972; **237**:120-1.
79. Luft T, Jefford M, Luetjens P, Toy T, Hochrein H, Masterman KA, Maliszewski C, Shortman K, Cebon J, Maraskovsky E. Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E(2) regulates the migratory capacity of specific DC subsets.
Blood 2002; **100**:1362-72.

-
80. Luft T, Pang KC, Thomas E, Hertzog P, Hart DN, Trapani J, Cebon J. Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells.
J Immunol 1998; **161**:1947-53.
81. Lundin J, Kimby E, Bergmann L, Karakas T, Mellstedt H, Osterborg A. Interleukin-4 therapy for patients with chronic lymphocytic leukaemia: a phase I/II study.
Br J Haematol 2001; **112**:155-60.
82. Marrack P, Kappler J, Mitchell T. Type I interferons keep activated T cells alive.
J Exp Med 1999; **189**:521-30.
83. Mattei F, Schiavoni G, Belardelli F, Tough DF. IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation.
J Immunol 2001; **167**:1179-87.
84. McRae BL, Beilfuss BA, van Seventer GA. IFN-beta differentially regulates CD40-induced cytokine secretion by human dendritic cells.
J Immunol 2000; **164**:23-8.
85. McRae BL, Nagai T, Semnani RT, van Seventer JM, van Seventer GA. Interferon-alpha and -beta inhibit the in vitro differentiation of immunocompetent human dendritic cells from CD14(+) precursors.
Blood 2000; **96**:210-7.
86. Mehindate K, al-Daccak R, Aoudjit F, Damdoui F, Fortler M, Borgeat P, Mourad W. Interleukin-4, transforming growth factor beta 1, and dexamethasone inhibit superantigen-induced prostaglandin E2-dependent collagenase gene expression through their action on cyclooxygenase-2 and cytosolic phospholipase A2.
Lab Invest 1996; **75**:529-38.
87. Menetrier-Caux C, Thomachot MC, Alberti L, Montmain G, Blay JY. IL-4 prevents the blockade of dendritic cell differentiation induced by tumor cells.
Cancer Res 2001; **61**:3096-104.
88. Muller U, Steinhoff U, Reis LF, Hemmi S, Pavlovic J, Zinkernagel RM, Aguet M. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense.
Science 1994; **264**:1918-21.

-
89. Murphy GP, Tjoa BA, Simmons SJ, Jarisch J, Bowes VA, Ragde H, Rogers M, Elgamal A, Kenny GM, Cobb OE, Ireton RC, Troychak MJ, Salgaller ML, Boynton AL. Infusion of dendritic cells pulsed with HLA-A2-specific prostate-specific membrane antigen peptides: a phase II prostate cancer vaccine trial involving patients with hormone-refractory metastatic disease.
Prostate 1999; **38**:73-8.
90. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells.
Nat Med 1998; **4**:328-32.
91. Niederau C, Heintges T, Lange S, Goldmann G, Niederau CM, Mohr L, Haussinger D. Long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon alpha for chronic hepatitis B.
N Engl J Med 1996; **334**:1422-7.
92. Nonn M, Schinz M, Zumbach K, Pawlita M, Schneider A, Durst M, Kaufmann AM. Dendritic cell-based tumor vaccine for cervical cancer I: in vitro stimulation with recombinant protein-pulsed dendritic cells induces specific T cells to HPV16 E7 or HPV18 E7.
J Cancer Res Clin Oncol 2003; **129**:511-20.
93. Paquette RL, Hsu NC, Kiertscher SM, Park AN, Tran L, Roth MD, Glaspy JA. Interferon-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells.
J Leukoc Biol 1998; **64**:358-67.
94. Paquette RL, Hsu NC, Said J, Mohammed M, Rao NP, Shih G, Schiller G, Sawyers C, Glaspy JA. Interferon-alpha induces dendritic cell differentiation of CML mononuclear cells in vitro and in vivo.
Leukemia 2002; **16**:1484-9.
95. Parlato S, Santini SM, Lapenta C, Di Pucchio T, Logozzi M, Spada M, Giammarioli AM, Malorni W, Fais S, Belardelli F. Expression of CCR-7, MIP-3beta, and Th-1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells: importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities.
Blood 2001; **98**:3022-9.

-
96. Paty DW, Li DK. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. UBC MS/MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Study Group.
Neurology 1993; **43**:662-7.
97. Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE. Interferons and their actions.
Annu Rev Biochem 1987; **56**:727-77.
98. Pfeffer LM, Dinarello CA, Herberman RB, Williams BR, Borden EC, Bordens R, Walter MR, Nagabhushan TL, Trotta PP, Pestka S. Biological properties of recombinant alpha-interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons.
Cancer Res 1998; **58**:2489-99.
99. Pilling D, Akbar AN, Girdlestone J, Orteu CH, Borthwick NJ, Amft N, Scheel Toellner D, Buckley CD, Salmon M. Interferon-beta mediates stromal cell rescue of T cells from apoptosis.
Eur J Immunol 1999; **29**:1041-50.
100. Radvanyi LG, Banerjee A, Weir M, Messner H. Low levels of interferon-alpha induce CD86 (B7.2) expression and accelerates dendritic cell maturation from human peripheral blood mononuclear cells.
Scand J Immunol 1999; **50**:499-509.
101. Randolph GJ, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking.
Science 1998; **282**:480-3.
102. Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Liebman RM, Schakel K. The CD16(+) (FcgammaRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting.
J Exp Med 2002; **196**:517-27.
103. Ranieri E, Herr W, Gambotto A, Olson W, Rowe D, Robbins PD, Kierstead LS, Watkins SC, Gesualdo L, Storkus WJ. Dendritic cells transduced with an adenovirus vector encoding Epstein-Barr virus latent membrane protein 2B: a new modality for vaccination.
J Virol 1999; **73**:10416-25.

104. Reid CD, Stackpoole A, Meager A, Tikerpae J. Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34+ progenitors in human bone marrow.

J Immunol 1992; **149**:2681-8.

105. Rieser C, Böck G, Klocker H, Bartsch G, Thurner M. Prostaglandin E2 and tumor necrosis factor alpha cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of interleukin-12 production.

J Exp Med 1997; **186**:1603-8.

106. Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood.

J Exp Med 1994; **180**:83-93.

107. Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G. Generation of mature dendritic cells from human blood: an improved method with special regard to clinical applicability.

J Immunol Methods 1996; **196**:137-51.

108. Rudick RA, Cohen JA, Weinstock-Guttman B, Kinkel RP, Ransohoff RM. Management of multiple sclerosis.

N Engl J Med 1997; **337**:1604-11.

109. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products.

J Exp Med 1995; **182**:389-400.

110. Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses.

Immunol Today 1998; **19**:568-74.

111. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin-4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha.

J Exp Med 1994; **179**:1109-18.

112. Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Schaniel C, Lenig D, Mackay CR, Qin S, Lanzavecchia A. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation.
Eur J Immunol 1998; **28**:2760-9.
113. Santini SM, Lapenta C, Logozzi M, Parlato S, Spada M, Di Pucchio T, Belardelli F. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice.
J Exp Med 2000; **191**:1777-88.
114. Schuler G, Koch F, Heufler C, Kampgen E, Topar G, Romani N. Murine epidermal Langerhans cells as a model to study tissue dendritic cells.
Adv Exp Med Biol 1993; **329**:243-9.
115. Schuler-Thurner B, Schultz ES, Berger TG, Weinlich G, Ebner S, Woerl P, Bender A, Feuerstein B, Fritsch PO, Romani N, Schuler G. Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells.
J Exp Med 2002; **195**:1279-88.
116. Sehgal PB, Sagar AD. Heterogeneity of poly(I) x poly(C)-induced human fibroblast interferon mRNA species.
Nature 1980; **288**:95-7.
117. Serhan CN, Haeggstrom JZ, Leslie CC. Lipid mediator networks in cell signaling: update and impact of cytokines.
FASEB J 1996; **10**:1147-58.
118. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes.
Nat Rev Immunol 2002; **2**:151-61.
119. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. The nature of principal type I interferon-producing cells in human blood.
Science 1999; **284**:1835-7.
120. Sornasse T, Flamand V, De Becker G, Bazin H, Tielemans F, Thielemans K, Urbain J, Leo O, Moser M. Antigen-pulsed dendritic cells can efficiently induce an antibody

response in vivo.

J Exp Med 1992; **175**:15-21.

121. Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Mantovani A. Chemokines and dendritic cell traffic.

J Clin Immunol 2000; **20**:151-60.

122. Sparwasser T, Koch ES, Vabulas RM, Heeg K, Lipford GB, Ellwart JW, Wagner H. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells.

Eur J Immunol 1998; **28**: 2045-54.

123. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity.

Annu Rev Immunol 1991; **9**:271-96.

124. Thurner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den Driesch P, Brocker EB, Steinman RM, Enk A, Kampgen E, Schuler G. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma.

J Exp Med 1999; **190**:1669-78.

125. Thurner B, Roder C, Dieckmann D, Heuer M, Kruse M, Glaser A, Keikavoussi P, Kampgen E, Bender A, Schuler G. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application.

J Immunol Methods 1999; **223**:1-15.

126. Thurner M, Klocker H, Papesh C, Ramoner R, Radmayr C, Hobisch A, Gastl G, Romani N, Ebner S, Bock G, Bartsch G. Dendritic cells for the immunotherapy of renal cell carcinoma.

Urol Int 1997; **59**:1-5.

127. Thurner M, Zelle-Rieser C, Ramoner R, Bartsch G, Holtl L. The disabled dendritic cell.

FASEB J 2001; **15**:1054-61.

128. Timmerman JM, Czerwinski DK, Davis TA, Hsu FJ, Benike C, Hao ZM, Taidi B, Rajapaksa R, Caspar CB, Okada CY, van Beckhoven A, Liles TM, Engleman EG, Levy R. Idiotypic-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune

responses in 35 patients.

Blood 2002; **99**:1517-26.

129. Tough DF, Borrow P, Sprent J. Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo.

Science 1996; **272**:1947-50.

130. Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity.

Adv Immunol 1998; **70**:83-243.

131. Wang C, Al-Omar HM, Radvanyi L, Banerjee A, Bouman D, Squire J, Messner HA. Clonal heterogeneity of dendritic cells derived from patients with chronic myeloid leukemia and enhancement of their T-cells stimulatory activity by IFN-alpha.

Exp Hematol 1999; **27**:1176-84.

132. Wang X, Chen M, Wandinger KP, Williams G, Dhib-Jalbut S. IFN-beta-1b inhibits IL-12 production in peripheral blood mononuclear cells in an IL-10-dependent mechanism: relevance to IFN-beta-1b therapeutic effects in multiple sclerosis.

J Immunol 2000; **165**:548-57.

133. Weinstock-Guttman B, Jacobs LD. What is new in the treatment of multiple sclerosis?

Drugs 2000; **59**:401-10.

134. Weiss K. Safety profile of interferon-alpha therapy.

Semin Oncol 1998; **25**:9-13.

135. Wetzler M, Kantarjian H, Kurzrock R, Talpaz M. Interferon-alpha therapy for chronic myelogenous leukemia.

Am J Med 1995; **99**:402-11.

136. Wilkinson PC, Liew FY. Chemoattraction of human blood T lymphocytes by interleukin-15.

J Exp Med 1995; **181**:1255-9.

137. Williams LA, Egner W, Hart DN. Isolation and function of human dendritic cells.

Int Rev Cytol 1994; **153**:41-103.

138. Zhou LJ, Schwarting R, Smith HM, Tedder TF. A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated

lymphocytes is a new member of the Ig superfamily.

J Immunol 1992; **149**:735-42.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
BHK-Zellen	Baby hamster kidney Zellen
CCR	Chemokinrezeptoren
CD	Cluster of differentiation
CD40L	CD40-Ligand
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
CO ₂	Kohlendioxid
DA	Dalton
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ELISA	Enzym-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FSC	Vorwärtsscatter
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
Gy	Gray
HBeAg	Hepatitis B e Antigen
HBV	Hepatitis B-Virus
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
MCP	Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Major histocompatibility complex
MIP-3 β	Macrophage inflammatory protein
MLR	Mixed lymphocyte reaction
MNC	Mononukleäre Zellen
MS	Multiple Sklerose
n	Anzahl
NAZ	Nicht adhärente Zellen
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
PBS	Phosphate-buffered saline

PDC	Plasmazytoide dendritische Zellen
PGE	Prostaglandin
PI	Propidium-Jodid
RANTES	Regulated on activation, normal T expressed and secreted
RNA	Ribonukleinsäure
SEM	Standard error of mean
SLC	Secondary lymphoid-tissue chemokine
SSC	Seitwärtsscatte
TNF	Tumornekrosefaktor
TT	Tetanus-Toxoid
U/ml	Units pro Milliliter

Danksagung

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Herrn Professor Dr. Stefan Endres für die Überlassung des Themas und die freundliche Aufnahme in seiner Abteilung. Hervorheben möchte ich insbesondere die kontinuierliche Unterstützung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit und die nette Zusammenarbeit in hervorragender Arbeitsatmosphäre innerhalb seiner Abteilung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Marc Dauer, der mich während der wissenschaftlichen Tätigkeit kontinuierlich und geduldig betreut hat und mir wichtige Anregungen gab. Daneben danke ich Herrn PD Dr. Andreas Eigler für die zusätzliche Betreuung innerhalb unserer Arbeitsgruppe.

Bei Frau Rosemarie Kiefl, MTA und Bianca Obermeier bedanke ich mich für ihre wertvolle Mitarbeit bei der Durchführung der Experimente.

Auch allen Doktoranden in der Abteilung für Klinische Pharmakologie sei für die gute Zusammenarbeit gedankt.

Veröffentlichungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in Teilen

A) in folgenden Publikationen veröffentlicht worden:

1. Dauer M, **Pohl K**, Obermaier B, Meskendahl T, Robe J, Schnurr M, Endres S, Eigler A. Interferon-alpha disables dendritic cell precursors: dendritic cells derived from interferon-alpha-treated monocytes are defective in maturation and T-cell stimulation. *Immunology* 2003; **110**:38-47.
2. Dauer M, Obermaier B, Herten J, Haerle C, **Pohl K**, Rothenfusser S, Schnurr M, Endres S, Eigler A. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *J Immunol* 2003; **170**:4069-76.

B) auf folgenden Kongressen vorgestellt worden:

1. Dauer M, **Pohl K**, Meskendahl T, Schnurr M, Endres S, Eigler A. *In vitro*-generation of potent antigen-presenting cells for immunotherapy: IL-4 is more effective than IFN- α . *Immunotherapy of Cancer*, Munich 2001.
2. **Pohl K**, Dauer M, Meskendahl T, Obermaier B, Herten J, Roebe J, Schnurr M, Endres S, Eigler A. IL-4 is required for the generation of dendritic cells with IFN-alpha from monocytes *in vitro*. *7th International Symposium on Dendritic Cells*, Bamberg 2002, P 352.
3. Obermaier B, Dauer M, **Pohl K**, Meskendahl T, Roebe J, Schnurr M, Endres S, Eigler A. Maturation of dendritic cells from monocytes within 48 hours: a new strategy for dendritic cell generation *in vitro*. *7th International Symposium on Dendritic Cells*, Bamberg 2002, P 347.
4. Dauer M, Meskendahl T, **Pohl K**, Obermaier B, Herten J, Roebe J, Schnurr M, Endres S, Eigler A. Strategies for antigen loading: pancreatic carcinoma cell lysates impair

function of dendritic cells *in vitro*.

7th International Symposium on Dendritic Cells, Bamberg 2002, P 127.

5. Dauer M, Meskendahl T, **Pohl K**, Schnurr M, Endres S, Eigler A. Zelluläre Immuntherapie des Pankreaskarzinoms: Pankreaskarzinomzell-Lysat beeinträchtigt die Funktion und das Überleben dendritischer Zellen.
XXX. Kongress der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern, Bad Kissingen 2002.

6. Dauer M, Meskendahl T, **Pohl K**, Roebe J, Obermaier B, Schnurr M, Endres S, Eigler A. Immuntherapie des Pankreaskarzinoms: Zytokin-vermittelte Hemmung der *in vitro*-Aktivität dendritischer Zellen durch Lysat aus Pankreaskarzinomzellen.
57. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, Bonn 2002.
Z Gastroenterol 2002; **40**:680.

Lebenslauf

Katrin Pohl

geboren am 18.10.1976 in München
deutsche Staatsangehörigkeit
ledig

Schulbildung

1983 – 1987	Grundschule, München
1987 – 1996	Ludwigsgymnasium, München
1996	Abitur

Akademische Ausbildung

1996 – 2003	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
August 1998	Physikum
August 1999	1. Staatsexamen
2001 - 2004	Promotion bei Herrn Prof. Dr. S. Endres, Abteilung für Klinische Pharmakologie, Medizinische Klinik Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München
April 2002	2. Staatsexamen
2002 - 2003	Praktisches Jahr: Universitätsklinik Innenstadt (Chirurgie), München Concord Repatriation General Hospital (Chirurgie), Sydney 1. Frauenklinik in der Maistraße, München Krankenhaus München Schwabing (Innere Medizin), München
April 2003	3. Staatsexamen
2003 - 2004	Ärztin im Praktikum bei Herrn Prof. Dr. Klaus Friese, 1. Frauenklinik in der Maistraße, Ludwig-Maximilians-Universität, München
seit Oktober 2004	Assistenzärztin bei Herrn Prof. Dr. Klaus Friese, 1. Frauenklinik in der Maistraße, Ludwig-Maximilians-Universität, München