

**Generierung dendritischer Zellen zur Tumorimmuntherapie:  
Differenzierung, Antigenbeladung und Reifung innerhalb von  
48 Stunden**

vorgelegt von  
Bianca Obermaier  
aus München  
2005



Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Generierung dendritischer Zellen zur Tumormimmuntherapie:  
Differenzierung, Antigenbeladung und Reifung innerhalb von  
48 Stunden**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Bianca Obermaier

aus München

2005



---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. S. Endres

Mitberichtersteller: Priv. Doz. Dr. H. Schmetzer  
Priv. Doz. Dr. U.Kummer

Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. A. Eigler  
Dr. med. M. Dauer

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2005



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Zielsetzung der Arbeit.....	1
1.1.1 Hintergrund.....	1
1.1.2 Fragestellung.....	2
1.2 Das humane Immunsystem .....	4
1.2.1 Die zwei Komponenten des humanen Immunsystems .....	4
1.2.2 Spezifische Antigenrezeptoren der erworbenen Immunität .....	5
1.2.3 Mustererkennungsmoleküle der angeborenen Immunität.....	6
1.3 Dendritische Zellen als Mittler zwischen angeborener und erworbener Immunität .....	7
1.3.1 Unreife dendritische Zellen als Antigen-aufnehmende Zellen.....	7
1.3.2 Reife dendritische Zellen als Antigen-präsentierende Zellen .....	8
1.3.3 Migration als Antwort auf Chemokine .....	9
1.3.4 Subtypen und Plastizität der dendritischen Zellen.....	12
1.3.4.1 Subtypen dendritischer Zellen in vivo .....	13
1.3.4.2 Subtypen dendritischer Zellen in vitro .....	15
1.4 Antigenprozessierung und – präsentation .....	16
1.4.1 Präsentation intrazytoplasmatischer Proteine auf MHC-I-Molekülen.....	17
1.4.2 Kreuzpräsentation exogener Antigene auf MHC-I-Molekülen .....	18
1.4.3 Präsentation exogener Proteine auf MHC-II-Molekülen.....	19
1.4.4 Präsentation von Lipid-Antigenen auf CD1-Molekülen .....	21
1.5 T-Zell-vermittelte Immunität .....	21
1.5.1 Aktivierung naiver CD4- und CD8-T-Zellen .....	21
1.5.2 Induktion der peripheren T-Zell-Toleranz .....	23
1.5.3 Aktivierung von T-Effektorzellen .....	24
1.6 Tumormuntherapie mit dendritischen Zellen .....	25
<b>2. Material &amp; Methoden</b>	<b>29</b>
2.1 Reagenzien und Geräte.....	29
2.1.1 Geräte .....	29
2.1.2 Reagenzien .....	29
Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterial .....	29
Radioaktive Chemikalien.....	30
Reagenziensätze .....	30
Antikörper .....	31

---

Materialien für die Zellkultur .....	31
Zytokine und Wachstumsstimulatoren .....	32
Chemokine .....	32
Häufig verwendete Puffer, Lösungen und Medien .....	32
2.2 Zellisolation und Zellkultur .....	33
2.2.1 Zellkulturen .....	33
2.2.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität.....	33
2.2.3 Gewinnung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut.....	34
2.2.4 Monozytenanreicherung aus PBMZ.....	35
2.2.4.1 Aufreinigung mittels Adhärenzschritt.....	35
2.2.4.2 Aufreinigung mittels magnetischer Zellseparation .....	36
2.2.5 Lymphozytenanreicherung aus PBMZ.....	36
2.2.6 Generierung dendritischer Zellen aus Monozyten <i>in vitro</i> .....	37
2.2.6.1 Standardmethode.....	37
2.2.6.2 Alternative Methoden .....	38
2.2.6.3 Einfrieren dendritischer Zellen .....	39
2.3 Analyseverfahren.....	39
2.3.1 Phasenkontrast- und Rasterelektronenmikroskopie .....	39
2.3.2 <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> .....	40
2.3.3 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	41
2.3.3.1 Nachweis der Expression von Oberflächenmolekülen.....	41
2.3.3.2 Intrazelluläre Kalziummessung zum Nachweis von Chemokinrezeptoren .....	42
2.3.3.3 Bestimmung der Endozytoseaktivität mittels FITC-Dextran .....	43
2.3.4 Analyse der T-Zell-stimulierenden Eigenschaften dendritischer Zellen ....	44
2.3.4.1 Antigenbeladung dendritischer Zellen .....	44
2.3.4.2 Autologe Kokultur dendritischer Zellen mit T-Zellen .....	44
2.3.4.3 Messung der proliferativen T-Zell-Antwort mit [ <sup>3</sup> H]-Thymidin .....	45
2.3.4.4 Standardisierte gemischte Lymphozytenreaktion (MLR).....	46
2.3.5 Statistische Auswertung.....	46
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>48</b>
3.1 Entwicklung einer neuen Methode zur beschleunigten Generierung dendritischer Zellen aus Monozyten <i>in vitro</i> : <i>FastDC</i> .....	48
3.1.1 Generierung reifer dendritischer Zellen aus Monozyten innerhalb von 48 Stunden .....	48
3.1.2 Einfluss von Interleukin-4 auf den Phänotyp dendritischer Zellen.....	50

3.1.3 Vergleich zweier Methoden zur beschleunigten Generierung dendritischer Zellen <i>in vitro</i> .....	53
3.1.4 Auswirkung verschiedener Monozyten-Isolationstechniken .....	55
3.2 Phänotypische Charakterisierung von <i>FastDC</i> .....	56
3.2.1 Vergleich der Expression charakteristischer Oberflächenmarker auf <i>FastDC</i> und Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen .....	56
3.2.2 Morphologische und durchflusszytometrische Charakterisierung von <i>FastDC</i> .....	58
3.3 Einfluss verschiedener proinflammatorischer Mediatoren und Zytokine auf die Reifung von <i>FastDC</i> .....	59
3.3.1 Wirkung einzelner proinflammatorischer Mediatoren auf <i>FastDC</i> .....	60
3.3.2 Identifikation der zur vollen Ausreifung der <i>FastDC</i> notwendigen proinflammatorischen Mediatoren .....	62
3.3.3 Modell der sequentiellen Stimulation der <i>FastDC</i> .....	63
3.4 Funktionelle Charakterisierung der <i>FastDC</i> .....	66
3.4.1 Untersuchung der Reaktion von <i>FastDC</i> auf inflammatorische und „lymphoide“ Chemokine .....	66
3.4.2 Endozytische Fähigkeiten von <i>FastDC</i> .....	68
3.4.3 Induktion der Proliferation und IFN- $\gamma$ -Sekretion autologer T-Zellen durch Antigen-beladene <i>FastDC</i> .....	69
3.4.4 Aktivierung autologer naiver T-Zellen durch Antigen-beladene <i>FastDC</i> ...	71
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>73</b>
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse .....	73
4.2 Methodendiskussion .....	74
4.2.1 Geschichte der Entdeckung und Charakterisierung dendritischer Zellen .	74
4.2.2 Standardprotokoll zur Generierung dendritischer Zellen aus Monozyten <i>in vitro</i> .....	76
4.2.3 Monozyten-abgeleitete dendritische Zelle im Vergleich mit. <i>FastDC</i> .....	77
4.2.4 Plastizität der Monozyten .....	79
4.3 Eigene Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur .....	80
4.3.1 Einfluss verschiedener proinflammatorischer Mediatoren auf die Expression der Oberflächenmarker, Zytokinsekretion und Funktionalität dendritischer Zellen .....	80
4.3.2 Das Modell der sequentiellen Stimulation .....	82
4.3.3 Monozyten als Vorläuferzellen dendritischer Zellen <i>in vivo</i> .....	84
4.3.4 Modelle zur beschleunigten Differenzierung dendritischer Zellen aus	

Monozyten <i>in vitro</i> .....	85
4.4 Klinische Relevanz .....	87
4.4.1 Dendritische Zellen in der klinischen Immunologie.....	87
4.4.2 <i>FastDC</i> bei der Tumorstimulation .....	89
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>93</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>95</b>
<b>7. Abkürzungen und Akronyme</b>	<b>111</b>
<b>8. Danksagung</b>	<b>113</b>
<b>9. Veröffentlichungen</b>	<b>114</b>
<b>10. Lebenslauf</b>	<b>116</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Zielsetzung der Arbeit

### 1.1.1 Hintergrund

In seiner Interaktion mit der Umwelt ist der menschliche Körper der ständigen Konfrontation mit verschiedenen Mikroorganismen ausgesetzt, die versuchen, in seinen Körper einzudringen. Um dabei sein Gleichgewicht zu wahren und Angriffe von außen abzuwehren, bedient sich der Körper verschiedener Mechanismen und Zellen, die unter dem Begriff Immunsystem zusammengefasst werden. Eine zentrale Rolle bei der Regulation der Immunantwort spielen dendritische Zellen (DCs). Diese sind Antigen-präsentierende Zellen (APCs), die die einzigartige Fähigkeit besitzen primäre Immunantworten, d.h. Immunantworten gegenüber einem dem Immunsystem bisher unbekanntem Antigen, hervorzurufen (Banchereau et al., 2000). Außerdem sind sie entscheidend an der Erzeugung immunologischer Toleranz und der Steuerung der T-Zell-vermittelten Immunität beteiligt (Banchereau et al., 1998).

DCs fungieren als Bindeglied zwischen den beiden Subtypen des Immunsystems, der angeborenen und erworbenen Immunität. Aufgabe des angeborenen Immunsystems ist es, möglichst schnell eingedrungene Pathogene zu erkennen und zu zerstören. Antigen-unspezifisch werden die Pathogene von phagozytären Zellen aufgenommen, die Rezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen, welche allgemein vorkommende Merkmale von Pathogenen erkennen. Gleichzeitig wird den Zellen des erworbenen Immunsystems die bestehende Gefahr signalisiert. Das erworbene Immunsystem zeichnet sich durch seine Antigen-spezifität und die Fähigkeit zur Bildung eines immunologischen Gedächtnisses aus. Unreife DCs nehmen als Zellen des angeborenen Immunsystems eingedrungene Pathogene in der Peripherie auf und wandern daraufhin in die sekundären lymphatischen Organe, wo sie naive Antigen-spezifische T-Zellen stimulieren und eine primäre Immunantwort hervorrufen (Banchereau et al., 2000).

Da es schwierig ist, DCs direkt aus dem peripheren Blut zu isolieren und zu kultivieren – DCs machen weniger als 1 % der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMZ) aus – wurden verschiedene Ansätze zur Generierung von DCs *in vitro* entwickelt. DCs können zwar auch *in vivo* durch Verabreichung der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren Flt-3 Ligand, *granulocyte macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) oder *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF) vermehrt werden (Lyman et al., 1998; Maraskovsky et al., 1996; Pulendran et al., 2000; Pulendran et al., 1999), die meisten Experimente nutzen jedoch die *in vitro* Generierung DC-ähnlicher Zellen aus CD34<sup>+</sup> Stammzellen des peripheren Blutes oder Monozyten (Caux et al., 1992; Zhou et al., 1996).

Am weitesten verbreitet ist die von Sallusto und Lanzavecchia bzw. Romani et al. 1994 publizierte Methode, bei der DCs erstmals aus adulten PBMZ anstatt aus Nabelschnurblut generiert wurden (Romani et al., 1994; Sallusto et al., 1994): Monozyten werden für 5 bis 7 Tage mit GM-CSF und Interleukin-4 (IL-4) inkubiert, um unreife DCs zu differenzieren (moDCs). Daraufhin werden die unreifen moDCs für weitere 24 bis 72 Stunden (h) mit proinflammatorischen Mediatoren oder mikrobiellen bzw. T-Zell-abhängigen Stimuli aktiviert, um die Ausreifung der DCs zu induzieren. Dieses Protokoll ist nicht nur einfach, sondern ermöglicht auch die Anreicherung stabiler DCs in ausreichender Menge und immunologischer Reife für die Anwendung in klinischen Studien.

### 1.1.2 Fragestellung

Der physiologische Prozess der Entstehung von DCs aus monozytären Vorläuferzellen *in vivo* ist nicht bekannt. In den letzten Jahren gab es jedoch Hinweise dafür, dass Monozyten auch *in vivo* Vorläuferzellen für DCs darstellen (Randolph et al., 1999).

In einem Modell, das die transendotheliale Migration von Zellen aus dem peripheren Gewebe in ein Lymphgefäß simuliert, differenzierte ein Teil der eingesetzten Monozyten innerhalb von 48 h zu reifen DCs (Randolph et al., 1998). Ebenso konnte gezeigt werden, dass in GM-CSF kultivierte Monozyten, die mit Kalzium-Ionophor (Cl)

oder CD40-Ligand (CD40-L) aktiviert wurden, innerhalb kurzer Zeit Aktivierungsmarker reifer DCs exprimierten (Czerniecki et al., 1997; Koski et al., 1999). Außerdem wurde beschrieben, dass es über Nacht in einer Kultur aus PBMZ zur spontanen Ausreifung von Monozyten zu DCs kam, die dem myeloiden Subtyp der DCs des peripheren Blutes ähnelten (Ho et al., 2002).

*In vivo* könnten Entzündungsmediatoren wie Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), die an Orten der Infektion und Entzündung produziert werden, Monozyten zur Differenzierung zu DCs anregen (Sato et al., 1997). IFN- $\alpha$  induziert *in vitro* innerhalb von 3 Tagen die Entwicklung von DCs aus Monozyten (Santini et al., 2000). Außerdem ist beschrieben, dass hohe Serumkonzentrationen von IFN- $\alpha$  mit dem Erwerb von DC-Charakteristika durch Monozyten, die aus peripherem Blut von Patienten mit systemischen Lupus erythematoses isoliert wurden, assoziiert sind (Blanco et al., 2001).

Das zentrale Ziel dieser Arbeit war es, eine neue Strategie zur beschleunigten *in vitro*-Generierung von DCs aus Monozyten zu entwickeln, die möglicherweise die Vorgänge der Differenzierung reifer DCs *in vivo* besser wiedergibt. Grundlage hierfür waren in unserem Labor durchgeführte Experimente, die zeigten, dass die Zugabe von IL-4 während der Stimulation von IFN- $\alpha$ -vorbehandelte Monozyten zur Entwicklung reifer DCs innerhalb von 24 h führt (Dauer et al., 2003). Dabei wurde aus verschiedenen Ansätzen die effektivste Methode ausgewählt und versucht folgende Fragen zu beantworten:

- Können reife und funktionsfähige DCs *in vitro* innerhalb von 48 h generiert werden?
- Welche proinflammatorischen Mediatoren sind für die Reifung von DCs innerhalb von 48 h von Bedeutung und wie beeinflussen diese die Zytokinsekretion?
- Wie verhalten sich DCs, die innerhalb von 48 h generiert wurden, im Vergleich zu den nach dem Standard-Protokoll generierten moDCs?

- Besitzen diese Zellen alle charakteristischen Funktionen von DCs: Reaktion auf Chemokine, Zytokinsekretion, Antigenaufnahme und –präsentation und Induktion Antigen-spezifischer T-Zell-Antworten?

## 1.2 Das humane Immunsystem

Das Immunsystem des Menschen unterstützt diesen bei der Erkennung und Abwehr fremder Organismen und Proteine, sog. Antigene. Dabei muss das Immunsystem die Antigene erkennen und ausschalten, ohne die körpereigenen, gesunden Strukturen anzugreifen. Die Unterscheidung von "Selbst" und "Fremd", worunter nicht nur eingedrungene Mikroorganismen sondern auch pathologisch veränderte eigene Zellen, wie Tumorzellen und virusinfizierte Zellen verstanden werden, ist eine der wichtigsten Fähigkeiten des Immunsystems.

### 1.2.1 Die zwei Komponenten des humanen Immunsystems

Das Immunsystem wird traditionell in zwei Komponenten eingeteilt – die unspezifische angeborene und die Antigen-spezifische erworbene Immunität (Janeway et al., 2002). Das erworbene Immunsystem wird durch zwei Klassen spezialisierter Zellen vertreten, die B- und T-Lymphozyten. Diese zeichnen sich durch ihre große Vielfalt an unterschiedlichen Antigenrezeptoren aus, welche somatisch während der Lymphozytenreifung durch Rekombination der Rezeptor-kodierenden Gene so angelegt werden, dass jeder Lymphozyt mit einem strukturell einzigartigen Antigenrezeptor ausgestattet wird. Lymphozyten, die auf ein Antigen treffen, das an ihren spezifischen Rezeptor bindet, werden aktiviert, um zu proliferieren und zu Effektorzellen zu differenzieren. Dieser Prozess der Vermehrung und Differenzierung eines Lymphozyten nach seiner spezifischen Antigenerkennung, der klonale Selektion genannt wird, stellt das zentrale Prinzip der erworbenen Immunabwehr dar. Durch die klonale Expansion der Lymphozyten auf Antigenstimulation im Rahmen einer Infektion

wird sichergestellt, dass genügend spezifische Effektor-Lymphozyten vorhanden sind, um eine effiziente Immunantwort zu generieren.

Da es jedoch mehrere Tage dauert bis eine ausreichende Zahl an klonal expandierten Lymphozyten erreicht ist und diese in Effektorzellen umgewandelt sind, muss es einen zweiten Mechanismus geben, der die Mikroorganismen sofort nach ihrem Eindringen in den Körper bekämpft: das angeborene Immunsystem. Nachdem es bereits in der frühen Phase einer Infektion in der Lage ist, eingedrungene Mikroorganismen zu erkennen und effektiv zu bekämpfen, dient es als Überbrückung der Zeitspanne bis zum Eingreifen der erworbenen Immunität. Durch die Mechanismen der angeborenen Immunität wie Phagozytose, Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Antigenpräsentation wird zudem die Aktivierung der erworbenen Immunität eingeleitet. Die beiden Komponenten zusammen bilden ein Abwehr-Konzept, in dem die Erkennungs- und Aktivierungsfunktion der angeborenen Immunität unerlässlich für die Auslösung und Steuerung der spezifischen Immunantwort ist.

### 1.2.2 Spezifische Antigenrezeptoren der erworbenen Immunität

Wie bereits erwähnt, bedient sich das erworbene Immunsystem bei der Antigenerkennung spezifischer T- und B-Zell-Rezeptoren (TZR bzw. BZR), die durch den Prozess der somatischen Rekombination zufällig gebildet werden. Dieser Vorgang macht es möglich, jeden Lymphozyten mit einem strukturell einzigartigen Antigenrezeptor mit äußerst hoher Spezifität auszustatten. Folglich ist das Repertoire der entstehenden Antigenerkennungsmechanismen in der Gesamtheit der Zellpopulation praktisch unendlich groß und mannigfaltig, wodurch wiederum die Wahrscheinlichkeit, dass für ein spezifisches Antigen ein „passender“ Lymphozyt existiert, erhöht wird. Im Laufe des Lebens werden so ca.  $10^{14}$  bis  $10^{18}$  verschiedene TZR und Immunglobuline generiert. Da diese Rezeptoren nicht in der Keimbahn kodiert werden, sondern von jeder Generation „neu erfunden“ werden müssen, sind sie nicht prädestiniert, ein bestimmtes Antigen zu erkennen. Vielmehr werden aus dem zufällig generierten Rezeptorrepertoire im Laufe des Lebens die „nützlichen“ Rezeptoren, die ihr spezifisches Antigen erkennen, ausgewählt und die dazugehörigen Lymphozyten zur klonalen Expansion angeregt.

### 1.2.3 Mustererkennungsmoleküle der angeborenen Immunität

Im Laufe der Evolution hat sich die angeborene Immunität lange vor der erworbenen Immunität herausgebildet. Im Gegensatz zum erworbenen Immunsystem werden die Erkennungsmechanismen der Zellen des angeborenen Immunsystems durch Keimbahn-kodierte Rezeptoren vermittelt, deren Spezifität somit genetisch determiniert und unveränderlich ist. Dies ist von Vorteil, da sich diese Rezeptoren, die sich zu Mikroorganismen-spezifischen Rezeptoren herausgebildet haben, von Generation zu Generation weiter vererben. Ein entscheidender Nachteil besteht jedoch darin, dass ihre Fähigkeit zur Erkennung von Mikroorganismen durch die geringe Spezifität der Rezeptoren erheblich eingeschränkt ist. So werden nur Oberflächenmoleküle erkannt, die bei zahlreichen Pathogenen vorkommen und im Laufe der Evolution konserviert wurden (Medzhitov et al., 2000). Es überrascht deshalb nicht, dass verschiedene Mikroorganismen Mechanismen entwickelt haben, um diese Art der Erkennung zu umgehen. Unter den Zellen des angeborenen Immunsystems, zu denen die verschiedenen Phagozyten zählen, sind lediglich DCs in der Lage diese Mikroorganismen über den rezeptorunabhängigen Mechanismus der Makropinozytose aufzunehmen und die Aktivierung der adaptiven Immunität einzuleiten (Sallusto et al., 1995).

Das angeborene Immunsystem verwendet eine Reihe verschiedener Rezeptoren, um Pathogene zu erkennen und darauf zu reagieren. Sie werden als Mustererkennungsmoleküle oder *pattern recognition receptors* (PRRs) bezeichnet, da sie einige hoch-konservierte Strukturen, die vielen Mikroorganismen gemeinsam sind, die sog. *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), erkennen. Die PRRs werden von vielen verschiedenen Effektorzellen der angeborenen Immunität exprimiert, insbesondere von APCs wie Makrophagen, Monozyten, DCs und B-Zellen (Aliprantis et al., 1999; Barton et al., 2002; Brightbill et al., 1999; Krug et al., 2001; Muzio et al., 1998; Peiser et al., 2002). Die auf die Rezeptorstimulation folgende Antwort der jeweiligen Zelle ist, im Gegensatz zur verzögerten Proliferationsantwort der Zellen der erworbenen Immunität, durch eine unmittelbare Reaktion gekennzeichnet.

## 1.3 Dendritische Zellen als Mittler zwischen angeborener und erworbener Immunität

### 1.3.1 Unreife dendritische Zellen als Antigen-aufnehmende Zellen

DCs zeichnen sich durch einzigartige Eigenschaften aus, die es ihnen ermöglichen eine effektive und spezifische Immunantwort gegen eindringende Pathogene zu induzieren (Bell et al., 1999; Steinman, 1991). Unreife DCs übernehmen dabei eine „Wächterfunktion“ (Banchereau et al., 1998). In nahezu allen peripheren Geweben des Körpers liegen DCs in ihrer unreifen Form vor. Die aus myeloiden Vorläuferzellen des Knochenmarks entstandenen Zellen wandern über das Blut in die peripheren Gewebe, wo sie ein dichtes Netzwerk bilden und ihre Umgebung kontrollieren. Durch Phagozytose und Endozytose nehmen unreife DCs extrazelluläre Bestandteile des umliegenden Gewebes auf, prozessieren diese und präsentieren sie als Peptide auf ihrer Oberfläche auf sog. MHC-Molekülen (MHC = *major histocompatibility complex*). Potentielle antigene Bestandteile werden somit „sichtbar“ für T-Zellen, die erst durch Präsentation prozessierter Peptide im MHC-Kontext in der Lage sind, Antigene zu erkennen (Svensson et al., 1997).

Aufgrund der geringen Expression kostimulierender Moleküle auf der Oberfläche unreifer DCs sind diese nicht in der Lage, T-Zellen zu stimulieren. Ihre Aufgabe besteht darin, eindringende Krankheitserreger zu erkennen und aufzunehmen. Dabei stehen ihnen verschiedene Mechanismen zur Verfügung: Phagozytose, Makropinozytose und rezeptorvermittelte Endozytose (Engering et al., 1997; Jiang et al., 1995; Reis e Sousa et al., 1993; Sallusto et al., 1995). Bei der Makropinozytose werden große pinozytotische Vesikel gebildet, die extrazelluläre Flüssigkeit und lösliche Antigene enthalten. Bei der rezeptorvermittelten Endozytose helfen die oben bereits beschriebenen PRRs dabei, hoch-konservierte molekulare Strukturen auf Mikroorganismen zu erkennen. DCs exprimieren ein breites Spektrum an PRRs, welches von sog. Scavenger-Rezeptoren bis zu *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs) reicht (Kadowaki et al., 2001; Krug et al., 2001).

Die Antigenaufnahme durch unreife DCs stellt ein Schlüsselereignis der Immunantwort dar, da Antigene die volle Ausreifung und Differenzierung von DCs induzieren können (Hsieh et al., 2001). So zeigte sich, dass die Stimulation von DCs mit mikrobiellen Bestandteilen maßgeblich an der effektiven Aktivierung bzw. Ausreifung von DCs und der anschließenden Induktion einer Immunantwort beteiligt ist (Sparwasser et al., 1998; Verdijk et al., 1999). Außerdem werden DCs durch Antigenaufnahme dazu veranlasst das Gewebe zu verlassen und in den drainierenden Lymphknoten auszuwandern, wo sie in den T-Zell-Arealen mit T-Zellen interagieren können. DCs sind über diesen Mechanismus in der Lage, Pathogene effektiv zu bekämpfen und eine Verbindung zwischen angeborener und spezifischer Immunität herzustellen (Banchereau et al., 2000).

### 1.3.2 Reife dendritische Zellen als Antigen-präsentierende Zellen

Während ihres Differenzierungsprozesses vollziehen DCs einen Wandel von der unreifen Antigen-aufnehmenden Zelle zur reifen Antigen-präsentierenden Zelle, die dazu in der Lage ist, primäre Immunantworten zu induzieren. Neben der Antigenaufnahme selbst sind eine Reihe verschiedener exogener Stimuli an der Induktion dieses Reifungsprozesses beteiligt: pathogene Moleküle, wie Lipopolysaccharid (LPS), proinflammatorische Zytokine, wie TNF- $\alpha$  und IL-6, und die Wechselwirkungen zwischen DC und T-Zelle über CD40-L (Caux et al., 1994a; Hartmann et al., 1999; Jonuleit et al., 1997; Rescigno et al., 1999). Die „Danger-Hypothese“ von Matzinger betont, dass neben diesen Signalen zusätzlich die Aussendung endogener Alarm-Signale aus gestressten oder verletzten Zellen in der Umgebung der DCs maßgeblich an der Aktivierung der DCs beteiligt ist (Matzinger, 1998). Diese endogenen Alarm-Signale beinhalten intrazelluläre Proteine aus nekrotischen Zellen oder Hitze-Schock-Proteine (hsp); Dies sind hoch konservierte Proteine, die von körpereigenen Zellen als Antwort auf Stress, z.B. bei Infektion oder Entzündung, freigesetzt werden.

Der Prozess der Ausreifung ist mit zahlreichen Veränderungen von Phänotyp und Funktion der DCs assoziiert (Tabelle 1). Die DCs verlieren ihre Fähigkeit zur Phagozytose und Endozytose, erwerben aber dafür die Fähigkeit zur

Antigenpräsentation im MHC-Kontext. Außerdem kommt es zur Expression des DC-Aktivierungsmarkers CD83, zur Zunahme kostimulierender Moleküle auf der Oberfläche der DCs und Sekretion immunregulativer Zytokine wie IL-12 (Cella et al., 1997; Cella et al., 1996).

Unreife DC	Reife DC
MHC-II intrazellulär	MHC-II auf der Oberfläche
Endozytose	–
wenige kostimulierende Moleküle (CD80, CD86)	viele kostimulierende Moleküle (CD80, CD86)
wenige T-Zell-aktivierende Moleküle (CD40)	viele T-Zell-aktivierende Moleküle (CD40)
kein CD83	viel CD83
kein IL-12	IL-12-Sekretion

**Tabelle 1:** Merkmale der DCs verändern sich während ihres Reifeprozesses.

Reife DCs sind die potentesten APCs des Immunsystems. Somit werden zur Stimulation naiver T-Zellen nur wenige reife DCs benötigt. Die Effektivität der DCs kann durch das Zusammenspiel verschiedener Faktoren erklärt werden: DCs exprimieren auf ihrer Oberfläche nicht nur 10 – 100 mal mehr MHC-Komplexe als andere APCs (B-Zellen, Makrophagen), sondern auch in hohem Maße zusätzliche Moleküle zur Adhäsion und Kostimulation von T-Zellen (Inaba et al., 1997). Außerdem sezernieren reife DCs u.a. IL-12, ein Zytokin, das sowohl Zellen der angeborenen als auch der erworbenen Immunantwort stimuliert (Reis e Sousa et al., 1997).

### 1.3.3 Migration als Antwort auf Chemokine

Chemokine sind eine Klasse von Zytokinen mit der Eigenschaft von Chemoattraktoren, die Zellen mit den passenden Rezeptoren veranlassen können, zur Quelle der Chemokine zu wandern. Es gibt vier Familien von Chemokinen. Die meisten Chemokine gehören den folgenden zwei Untergruppen an: CC-Chemokine, bei denen in der Aminosäuresequenz zwei Cysteine benachbart sind, und CXC-Chemokine, bei

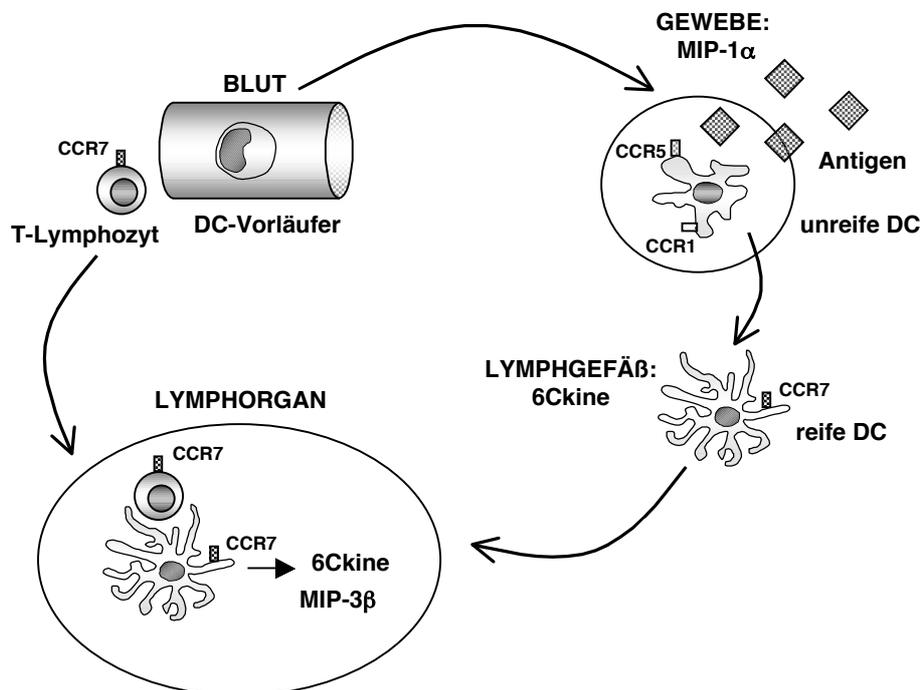
denen die beiden Cysteine durch eine weitere Aminosäure getrennt sind. Entsprechend heißen die Rezeptoren CC-Rezeptoren (CCR) oder CXC-Rezeptoren (CXCR) (Sozzani et al., 1998).

DCs können abhängig von ihrem jeweiligen Aktivierungsgrad auf verschiedene Chemokine reagieren (Tabelle 2): während sich unreife DCs im peripheren Gewebe aufhalten, wandern reife DCs in die T-Zell-Regionen sekundärer lymphatischer Organe aus. DC-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark werden auf dem Blutweg durch Chemokine und Zytokine in Gebiete der lokalen Entzündung und Infektion gelockt. So konnte gezeigt werden, dass sich unreife DCs nach Antigeninhalation innerhalb einer Stunde am Ort der Antigen deposition im bronchialen Epithel der Atemwege versammeln und dass sie den ersten einwandernden Zelltyp darstellen (McWilliam et al., 1996; McWilliam et al., 1994). Verantwortlich sind hierfür eine Reihe von Chemokinen, wie *macrophage inflammatory protein* (MIP-)  $1\alpha$ , MIP- $3\alpha$  und RANTES, die an spezifische Rezeptoren auf der Zellmembran unreifer DCs binden (Abbildung (Abb.) 1) (Dieu-Nosjean et al., 1999; Sallusto et al., 1998; Sozzani et al., 1999). Ferner sind DCs selbst in der Lage, unmittelbar auf einen pathogenen Stimulus durch Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen zu reagieren und somit dazu beizutragen, dass weitere Immunzellen zum Fokus der Infektion rekrutiert werden und Effektorzellen der angeborenen Immunität aktiviert werden (Adema et al., 1997).

Kommt es zur Antigenaufnahme durch unreife DCs, sorgen proinflammatorische Mediatoren dafür, dass die Chemokinrezeptoren der unreifen DCs internalisiert oder desensitiviert werden. Gleichzeitig kommt es zur vermehrten Expression des Chemokinrezeptors 7 (CCR7), dessen Ligand 6CKine (= SLC, *secondary lymphoid tissue chemokine*) in lymphatischen Gefäßen exprimiert wird (Chan et al., 1999; Saeki et al., 1999). So verlassen Antigen-beladene DCs die Entzündungsgebiete und treten in den Lymphstrom ein, der sie zu den sekundären lymphatischen Organen transportiert. Die Wanderung der DCs aus dem peripheren Gewebe über die afferente Lymphe in Lymphknoten folgt auf den Reifungsprozess der DCs.

In den Lymphknoten angekommen wandern die reifen DCs in die T-Zell-Regionen der lymphatischen Organe, wo ebenfalls 6CKine und ein weiterer Ligand von CCR7, MIP- $3\beta$ , gebildet werden. In den T-Zell-Regionen neu rekrutierte DCs sind vermutlich

ebenfalls an der Bildung dieser Chemokine beteiligt, so dass die Persistenz des chemotaktischen Signals aufrechterhalten wird und es zu einer Amplifikation des Signals kommt. Da die beiden Chemokine 6Ckine und MIP-3 $\beta$  neben reifen DCs auch naive T-Zellen anlocken, kann ein besseres Zusammentreffen der DCs mit Antigen-spezifischen T-Zellen gewährleistet werden (Abb. 1) (Campbell et al., 1998; Gunn et al., 1998). Experimentell konnte in der Maus gezeigt werden, dass Langerhans-Zellen (LCs), die unreifen DCs der Haut, nach epikutaner Sensibilisierung von der Haut in die regionalen Lymphknoten auswandern (Kripke et al., 1990; Larsen et al., 1990; Lukas et al., 1996; Macatonia et al., 1987).



**Abbildung 1: Rolle der Chemokine bei der Migration von DCs.** Inflammatorische Chemokine wie MIP-1 $\alpha$  locken DC-Vorläuferzellen an Orte lokaler Entzündung. Nach Antigenaufnahme durch unreife DCs kommt es zur vermehrten Expression von CCR7 auf deren Oberfläche. Die Liganden von CCR7, 6Ckine und MIP-3 $\beta$ , werden in Lymphgefäßen und sekundären lymphatischen Organen exprimiert, so dass die heranreifenden DCs in die T-Zellregionen der Lymphorgane auswandern. Dort angekommen beteiligen sich DCs selbst an der Bildung von Chemokinen, um ein besseres Zusammentreffen mit naiven T-Lymphozyten, die ebenfalls CCR7 auf ihrer Oberfläche tragen, zu gewährleisten.

Chemokinrezeptoren sind integrale Membranproteine mit sieben membrandurchspannenden Helices und angekoppelten G-Proteinen (Dieu et al., 1998). Kommt es zur Bindung eines Liganden, so wird ein Mitglied einer Gruppe trimerer GTP-bindender Proteine (große G-Proteine) aktiviert. Dies wiederum führt zur

Aktivierung der Liganden der G-Proteine. Die beiden wichtigsten Liganden sind die Adenylatcyclase und Phospholipase-C, die ihrerseits aktiviert werden und weitere Signaltransduktionsketten in Gang setzen. Phospholipase-C spaltet Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP<sub>2</sub>) auf in Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG). IP<sub>3</sub> bindet an einen Rezeptor des endoplasmatischen Reticulums (ER), der zur Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher und zur Öffnung der Kalzium-Kanäle in der Plasmamembran führt. Die dadurch hervorgerufene Erhöhung des intrazellulären Kalziums bewirkt zusammen mit DAG eine Aktivierung von Proteinkinasen der C-Familie, die ihrerseits mehrere Signalübertragungswege in Richtung Zellkern eröffnen.

Chemokinrezeptor	Ligand
<b>Unreife DC</b>	
CCR 1	MIP-1 $\alpha$ , RANTES, MCP-3, MIP-5
CCR2	MCPs
CCR4	TARC, MDC
CCR5	MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES
CCR6 (nur LCs)	MIP-3 $\alpha$
CXCR1	IL-8
CXCR4	SDF-1
<b>Reife DC</b>	
CCR7	6CKine, MIP-3 $\beta$
CXCR4	SDF-1

**Tabelle 2:** Expression der Chemokinrezeptoren auf unreifen und reifen DCs.

#### 1.3.4 Subtypen und Plastizität der dendritischen Zellen

DCs wurden 1973 erstmals von Steinman und Mitarbeitern an der Rockefeller Universität in New York entdeckt (Hart, 1997). Seit ihrer Erstbeschreibung hat sich gezeigt, dass DCs eine heterogene Population von Zellen darstellen, die sich in Ursprung und Stadien der Differenzierung unterscheiden und weiterhin durch

unterschiedliche spezifische Funktionen und migratorische Profile charakterisiert sind. Die unterschiedlichen, z. T. gegensätzlichen Aufgaben, die DCs zu erfüllen haben – wie die Induktion von Immunität oder Toleranz, die Induktion einer  $T_H1$ -Antwort oder  $T_H2$ -Antwort – können nicht alle von ein und derselben Zelle durchgeführt werden. Die Schlussfolgerung daraus ist, dass es verschiedene DC-Subtypen mit verschiedenen Funktionen geben muss.

Zwei unterschiedliche Modelle versuchen dieses Phänomen zu erklären. Das erste Modell geht davon aus, dass die verschiedenen Subtypen unterschiedliche Aktivierungsgrade nur einer Zelllinie repräsentieren, wobei die funktionellen Unterschiede vom lokalen Milieu abhängen (*functional plasticity model*). Das zweite Modell dagegen propagiert, dass sich die verschiedenen DC-Subtypen vollkommen getrennt voneinander entwickeln. Bereits die Vorstufen würden sich in Phänotyp und Funktion unterscheiden (*specialized lineage model*). Die Realität liegt wahrscheinlich dazwischen (Shortman et al., 2002).

#### 1.3.4.1 Subtypen dendritischer Zellen *in vivo*

Vier Stufen der DC-Entwicklung sind bekannt: (1) Vorläuferzellen im Knochenmark, (2) in Blut und Lymphe patrouillierende „Wächter-DCs“, die bei Antigenerkennung verschiedene Zytokine zur Eindämmung der Entzündung sezernieren, (3) gewebeständige unreife DCs mit hoher endozytotischer und phagozytotischer Kapazität und (4) reife DCs in den sekundären lymphatischen Organen, die in hohem Maße kostimulierende und Antigen-präsentierende Moleküle exprimieren (Banchereau et al., 2000).

Mindestens drei Subtypen humaner DCs können *in vivo* unterschieden werden: interstitielle gewebeständige DCs in Haut und Lymphorganen und zwei Subtypen im peripheren Blut. Langerhans-DCs der Haut können als eigene Untergruppe mit spezifischen Markern angesehen werden: Sie exprimieren auf ihrer Oberfläche CD1a und Langerin und enthalten sog. Birbeck-Granula, von denen angenommen wird, dass sie Teil des Antigen-prozessierenden Systems sind (Caux et al., 1997).

In wenigen Fällen wurden DCs aus lymphatischen Organen isoliert und untersucht. In Milz und Tonsillen finden sich DCs mit großer Heterogenität in der Expression der Oberflächenmarker CD4, CD11b und CD11c (McIlroy et al., 1995). Die Verwandtschaft der einzelnen Subtypen ist unklar, jedoch deuten Studien, die an DCs im Thymus durchgeführt wurden, eher auf getrennte Subtypen hin. DCs im Thymus sind größtenteils CD11c<sup>+</sup>, CD11b<sup>-</sup>, exprimieren wenig CD45RO und tragen keine myeloiden Marker auf ihrer Oberfläche (Bendriss-Vermare et al., 2001).

Aus dem Blut können zwei verschiedene DC-Subtypen isoliert werden: CD11c<sup>+</sup> DCs und CD11c<sup>-</sup> DCs. Aufgrund der unterschiedlichen Expression der Oberflächenmarker auf beiden Subtypen – CD11c<sup>+</sup> DCs exprimieren myeloide Marker, CD11c<sup>-</sup> DCs lymphoide – liegt die Vermutung nahe, dass die beiden Subtypen von unterschiedlichen Vorläufern abstammen, myeloid und lymphoid. Diese Hypothese wird nicht nur dadurch bestärkt, dass für die Entwicklung der beiden Subtypen unterschiedliche Wachstumsfaktoren und Transkriptionsfaktoren notwendig sind, sondern auch durch ihre unterschiedliche funktionelle Spezialisierung (Spits et al., 2000). Sie zeichnen sich durch unterschiedliche Profile der Zytokinsekretion und der TLR-Expression aus (Hornung et al., 2002; Kadowaki et al., 2001; Krug et al., 2001).

Da die TLR-Rezeptoren auf unterschiedliche mikrobielle Stimuli reagieren, führte die Entdeckung der verschiedenen Expressionsmuster auf den beiden Zelltypen zu der Annahme, dass sich die beiden DC-Subtypen im Laufe der Evolution unterschiedlich „spezialisiert“ haben, um verschiedene Pathogene zu erkennen (Shortman et al., 2002). Im Laufe der Reifung der DCs kommt es zum Verlust der TLR-Expression, da reife DCs keine mikrobiellen Stimuli mehr erkennen müssen, sondern T-Zellen aktivieren sollen. Auch hierbei können funktionelle Unterschiede zwischen myeloiden und lymphoiden DCs festgestellt werden.

Die meisten Erkenntnisse über die unterschiedliche Funktion der DC-Subtypen wurden bisher jedoch nicht durch ihre direkte Isolation, sondern durch *in vitro* Experimente gewonnen und werden deshalb im nächsten Abschnitt behandelt. In wieweit sich die an *in vitro* generierten DCs gewonnenen Ergebnisse auf DCs *in vivo* übertragen lassen, ist allerdings noch nicht geklärt.

#### 1.3.4.2 Subtypen dendritischer Zellen *in vitro*

Drei verschiedene Vorläuferzellen dienten bisher als Startpunkte für die *in vitro* Generierung von DCs. Die ersten Experimente wurden mit CD34<sup>+</sup> Zellen aus dem Knochenmark oder Nabelschnurblut durchgeführt (Young et al., 1995). Dies sind Vorläuferzellen für alle Blutzellen – darunter auch für DCs. Die Inkubation mit GM-CSF und TNF- $\alpha$  führt zur Bildung zweier Zwischenstufen – vermutlich myeloid und lymphoid – von denen aus zwei unterschiedliche Wege der DC-Entwicklung eingeschlagen werden (Caux et al., 1997).

Aus der myeloiden Vorstufe können in Gegenwart von *transforming growth factor* (TGF- $\beta$ ) LC-ähnliche DCs entstehen, welche Birbeck-Granula enthalten und charakteristische Oberflächenmarker exprimieren (Ito et al., 1999; Strobl et al., 1996). Desweiteren können sich daraus interstitielle DCs entwickeln, die keine Birbeck-Granula enthalten und auf ihrer Oberfläche CD9, CD68 und den Gerinnungsfaktor XIIIa exprimieren. Die Zwischenstufe auf dem Weg der LC-Entwicklung trägt auf ihrer Oberfläche CLA (*skin homing receptor*), exprimiert kein CD14 und kann sich nicht in Makrophagen differenzieren (Strunk et al., 1997). Die Zwischenstufe auf dem Weg zur Bildung interstitieller DCs trägt auf ihrer Oberfläche kein CLA, dafür aber das typische myeloide Differenzierungsantigen CD14 und ähnelt Monozyten in vieler Hinsicht, z.B. bildet sie in Gegenwart von M-CSF Makrophagen und keine DCs. Durch Zugabe anderer Zytokine, u. a. IL-3, zu CD34<sup>+</sup> Zellen können DCs mit ausschließlich lymphoiden Markern aus CD34<sup>+</sup> Vorläufern generiert werden (Galy et al., 1995).

Plasmazytoide Interferon-produzierende Zellen (IPCs) wurden im Menschen als Vorläuferzellen identifiziert. Sie sind CD4<sup>+</sup>, IL-3-Rezeptor<sup>+</sup> und CD11c<sup>-</sup> (Siegal et al., 1999). Da sie lymphoide Oberflächenmarker exprimieren, wird vermutet, dass sie lymphoide Herkunft sind. Sie sehen wie Antigen-produzierende Plasmazellen aus, entwickeln sich aber unter dem Einfluss von IL-3 und CD40-L zu reifen plasmazytoiden DCs (PDCs) (Grouard et al., 1997).

Die am häufigsten als Vorläufer verwendeten Zellen sind Monozyten (CD13<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>) (Zhou et al., 1996). In der Gegenwart von M-CSF werden Monozyten zu Makrophagen, werden sie jedoch für 6 Tage mit GM-CSF und IL-4

inkubiert, entwickeln sich unreife DCs. Durch Stimulation der unreifen DCs für weitere 24 bis 48 h entwickeln sich voll ausgereifte DCs (moDCs), die kein CD14, jedoch in hohem Maße CD83, CD86 und MHC-II exprimieren (Romani et al., 1996; Sallusto et al., 1994).

Somit können mindestens drei unterschiedliche DC-Vorläufer identifiziert werden: CD34<sup>+</sup> Zellen, Monozyten als myeloide Vorläufer und IPCs als lymphoide Vorläufer.

Reife moDCs können im Gegensatz zu reifen PDCs IL-12 sezernieren und damit die Entstehung einer T<sub>H</sub>1-Antwort induzieren, während PDCs eher T<sub>H</sub>2-Antworten hervorrufen (Rissoan et al., 1999). Die funktionelle Plastizität der verschiedenen Subtypen erschwert allerdings ihre genaue Zuordnung zu einer bestimmten Funktion (Liu et al., 2001; Tanaka et al., 2000). So sind moDCs trotz ihrer bevorzugten Grundtendenz zur Induktion von T<sub>H</sub>1-Antworten, unter bestimmten äußeren Bedingungen durchaus dazu in der Lage T<sub>H</sub>2-Antworten induzieren. Dafür verantwortlich ist die Behandlung mit antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10, mit Steroiden oder mit PGE<sub>2</sub> (Buelens et al., 1997; De Smedt et al., 1997; Liu et al., 1998; Takeuchi et al., 1997).

## 1.4 Antigenprozessierung und – präsentation

T-Zellen stellen mit einem Anteil von ca. 70 % die größte Lymphozytenpopulation der PBMZ dar. Mit ihrem durch das Genrearrangement jeweils einzigartigen TZR können T-Zellen fremde Antigene nur erkennen, wenn sie ihnen in prozessierter Form als kurzkettige Peptide auf der Oberfläche von körpereigenen APCs präsentiert werden. Es gibt drei Subtypen professioneller APCs: DCs, Makrophagen und B-Zellen, von denen DCs die potentesten APCs darstellen. Intrazellulär gebildete oder über Endozytose aufgenommene Peptide bzw. Proteine werden von spezialisierten Glykoproteinen an die Zelloberfläche transportiert. Die Gengruppe, welche für diese Glykoproteine kodiert, wurde aufgrund ihrer starken Wirkung auf die Immunantwort auf transplantiertes Gewebe entdeckt und wird deshalb *major histocompatibility complex*

(MHC) genannt; die exprimierten Proteine sind hochpolymorph und heißen MHC-Moleküle.

Es sind zwei verschiedene MHC-Moleküle bekannt: MHC-I wird von beinahe jeder körpereigenen Zelle gebildet. Die auf MHC-I präsentierten Peptide stammen von im Zytosol gebildeten Proteinen und werden von CD8-T-Zellen erkannt. MHC-II dagegen findet sich nur auf der Oberfläche der professionellen APCs (DCs, Makrophagen, B-Zellen) und präsentiert Peptide von Antigenen, die mittels Endozytose aus dem Extrazellulärraum aufgenommen wurden. MHC-II führt zur Aktivierung von CD4-T-Zellen, welche daraufhin entweder zu  $T_H1$ - oder zu  $T_H2$ -Zellen differenzieren. CD4 und CD8 sind Korezeptoren auf der Oberfläche der T-Zellen, welche an unveränderliche Stellen der MHC-Komplexe binden, wobei CD8 mit MHC-I und CD4 mit MHC-II in Wechselwirkung tritt. Die beiden Korezeptoren erhöhen die Empfindlichkeit der T-Zelle für das präsentierte Antigen so stark, dass sich die zur Aktivierung der T-Zelle benötigte Antigenmenge auf ein Hundertstel verringert.

#### 1.4.1 Präsentation intrazytoplasmatischer Proteine auf MHC-I-Molekülen

Alle Proteine einer Zelle werden im Zytosol synthetisiert – so auch Proteine intrazellulärer Viren, welche die Biosynthesemechanismen der infizierten Zelle übernehmen. Polypeptidketten, die für die Zelloberfläche bestimmt sind – u. a. die der beiden MHC-Klassen – werden während ihrer Synthese aus dem Zytosol in das Lumen des ER transportiert, wo sie korrekt zusammengebaut, gefaltet und weiter an die Zelloberfläche befördert werden. Da die Peptidbindungsstelle des MHC-I-Komplexes erst im Lumen des ER gebildet wird, kann die Bindung intrazytoplasmatischer Peptide verhindert werden.

Zytosolische Proteine unterliegen einem ständigen Auf- und Abbau. Der Abbau der Proteine und damit auch die Prozessierung von Antigenen beginnen im Zytosol mit der Bindung von Ubiquitin an die abzubauenen Moleküle. Die ubiquitinylierten Proteine werden zum Proteasom, einem multikatalytischen Proteasekomplex, gelenkt und dort zu Peptiden abgebaut (Rock et al., 1999). Die so entstandenen Peptide, die für die

Präsentation auf MHC-I bestimmt sind, müssen ins ER eingeschleust werden. Der ATP-abhängige Transport erfolgt durch ein Heterodimer, welches sich aus den beiden *Transporters associated with antigen processing* (TAP) -1 und -2 zusammensetzt und mit dem ER assoziiert ist.

Die Bindung eines Peptids an den MHC-I-Komplex ist ein wichtiger Schritt im Zusammenbau des Moleküls, da unbeladene MHC-Moleküle instabil sind und nach Rücktransport ins Zytosol abgebaut werden. Der Zusammenbau des MHC-I-Moleküls erfordert jedoch zunächst die Assoziation seiner beiden Untereinheiten, der  $\alpha$ -Kette mit dem  $\beta_2$ -Mikroglobulin. Die neu synthetisierte  $\alpha$ -Kette wird ins ER geschleust, wo sie an das Chaperon-Protein Calnexin bindet, das die Aufgabe besitzt Proteine in partiell gefalteter Form im ER zurückzuhalten. Sobald  $\beta_2$ -Mikroglobulin an die  $\alpha$ -Kette bindet, dissoziiert Calnexin von dem entstandenen MHC-I-Komplex. Durch die Anlagerung an einen Proteinkomplex wird eine Brücke zwischen MHC-I und TAP-1 und -2 gebildet und somit die Bindung eines Peptids an MHC-I ermöglicht. Wird ein Peptid gebunden, löst sich der MHC-I-Peptid-Komplex von dem Proteinkomplex und wird an die Zelloberfläche transportiert (Pamer et al., 1998).

#### 1.4.2 Kreuzpräsentation exogener Antigene auf MHC-I-Molekülen

Bevan und Mitarbeiter konnten 1976 zeigen, dass eine Induktion spezifischer zytotoxischer T-Zellen nicht nur gegen intrazelluläre auf MHC-I präsentierte Peptide sondern auch gegen endozytotisch aufgenommenes Antigen stattfindet (Bevan, 1976). Daraus ergab sich die Schlussfolgerung, dass auch auf MHC-I-Komplexen Peptide extrazellulärer Proteine präsentiert werden können. Dieses Phänomen wurde Kreuzpräsentation genannt.

Zwei verschiedene Wege führen zur Präsentation exogener Pathogene auf MHC-I-Molekülen: es gibt einen TAP-unabhängigen Weg, bei dem die Antigene vermutlich in Endosomen abgebaut werden (ähnlich MHC-II, siehe 1.4.3.), und einen TAP-abhängigen Weg, bei dem Antigene aus den Phagosomen ins Zytoplasma entlassen, dort abgebaut und die Peptide ins ER geschleust werden (Brossart et al.,

1997; den Haan et al., 2000; Kovacsovics-Bankowski et al., 1993; Pfeifer et al., 1993). Es wird angenommen, dass Kreuzpräsentation sowohl eine Rolle in der Induktion von Immunantworten, z.B. gegenüber Antigenen von Transplantaten, Tumoren oder nicht-intrazellulären Viren, spielt, als auch an der Entwicklung von Toleranz gegenüber körpereigenen Proteinen beteiligt ist (Huang et al., 1994; Kurts et al., 1997b; Sigal et al., 1999). Bestimmtes exogen aufgenommenes Material scheint durch einen noch nicht verstandenen molekularen Mechanismus bevorzugt auf MHC-I-Komplexen präsentiert zu werden (Bender et al., 1995; Shen et al., 1997).

So wurde beschrieben, dass dies insbesondere für mit hsp-Proteinen assoziierte Peptide gilt (Singh-Jasuja et al., 2000). Die hsp-Peptid-Komplexe werden über spezifische Rezeptoren durch spontane rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen. Anschließend findet eine Übertragung der assoziierten Moleküle auf MHC-I statt. Es wird vermutet, dass bei der Endozytose bereits auf der Oberfläche befindliches MHC-I gemeinsam mit Rezeptor-gebundenem hsp aufgenommen wird (Arnold-Schild et al., 1999). Eine andere Möglichkeit, MHC-I-Moleküle mit Peptiden exogener Antigene zu beladen, ist die Aufnahme und Prozessierung apoptotischer Zellen (Albert et al., 1998a; Albert et al., 1998b; Sauter et al., 2000). So konnte gezeigt werden, dass moDCs, die mit apoptotischen Körperchen Influenza-Virus-infizierter Makrophagen beladen wurden, die Proliferation Influenza-spezifischer T-Zellen und die Bildung Influenza-spezifischer CD8-T-Zellen bewirken (Bhardwaj et al., 1994).

#### 1.4.3 Präsentation exogener Proteine auf MHC-II-Molekülen

Gewöhnlich jedoch werden durch Endozytose aufgenommene Antigene auf MHC-II-Komplexen professioneller APCs präsentiert (Inaba et al., 1998; Villadangos, 2001). Ebenso werden Proteine sich intrazellulär vermehrender Bakterien wie Mykoplasmen oder Leishmanien, deren Vermehrung in Vesikeln der APCs stattfindet, mittels MHC-II auf der Oberfläche dieser Zellen dargeboten (Inaba et al., 1993; Moll et al., 1993). Der pH-Wert der Endosomen mit aufgenommenen Antigenen wird zunehmend in den sauren Bereich verschoben. Dadurch werden die Cysteinproteasen Cathepsin B, C, L und S aktiviert, die Proteine in kleinere Peptidfragmente zerlegen. An irgendeinem

Punkt fusionieren die angesäuerten Vesikel mit anderen Vesikeln, die MHC-II-Komplexe enthalten, welche die Peptidfragmente binden.

Der MHC-II-Komplex setzt sich aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette zusammen, die im ER mit einem weiteren Protein, der invarianten Kette (Ii) assoziiert sind. Diese blockiert die Peptidbindungsfurche des MHC-II-Moleküls und verhindert somit, dass Peptide des ER an den MHC-II-Komplex binden (Castellino et al., 1997). Eine weitere Aufgabe der Ii besteht darin, den Transport des MHC-II-Komplexes aus dem ER zu den angesäuerten Endosomen zu dirigieren. Dort zerschneidet die Protease Cathepsin S die Ii schrittweise bis nur noch ein kleines Fragment, das *class-II-associated invariant-chain peptide* (CLIP) Fragment, die Peptidbindungsfurche besetzt. Das CLIP-Fragment muss entweder abdissoziieren oder verdrängt werden, damit ein Peptid gebunden und mit dem MHC-II-Komplex an die Oberfläche transportiert werden kann.

Der proteolytische Abbau der Ii wird durch das Verhältnis von Cathepsin S zu seinem endogenen Inhibitor Cystatin C reguliert (Pierre et al., 1998). Während des Differenzierungsprozesses von DCs wird durch die verminderte Expression von Cystatin C die Aktivität von Cathepsin S gesteigert, wodurch mehr MHC-II-Moleküle mit Peptiden beladen und zur Zelloberfläche transportiert werden. Wo genau die Spaltung der Ii und die Bindung des Peptids statt findet ist nicht bekannt.

Es wird jedoch vermutet, dass dieser Prozess in einer späten Phase des Abbauwegs in spezialisierten Vesikeln, den MHC-II-Kompartimenten (MIICs), lokalisiert ist (Kleijmeer et al., 1995; Pierre et al., 1997). Unreife DCs häufen kontinuierlich MHC-II-Moleküle in diesen Kompartimenten, die eine multilamelläre und multivesikuläre Struktur besitzen, an. Außerdem enthalten diese Kompartimente ein weiteres MHC-II-ähnliches Molekül, HLA-DM, welches durch seine Bindung leere MHC-II-Moleküle stabilisiert und zudem die Freisetzung des CLIP-Fragments sowie die Peptidbindung katalysiert (Nijman et al., 1995). MHC-II-Komplexe, die kein Peptid binden sind ebenso wie unbeladene MHC-I-Komplexe instabil und werden ohne Stabilisierung durch HLA-DM abgebaut.

#### 1.4.4 Präsentation von Lipid-Antigenen auf CD1-Molekülen

Neben den MHC-Molekülen sind weitere Antigen-präsentierende Moleküle bekannt, die von MHC-ähnlichen Genen kodiert werden. Ein Beispiel ist die CD1-Familie (Blumberg et al., 1995; Porcelli et al., 1999). Diese Moleküle werden ähnlich wie MHC-II-Moleküle über einen TAP-unabhängigen Weg in intrazellulären Vesikeln sowohl mit intrazellulären als auch extrazellulären Antigenen beladen. Sie binden vor allem Glykolipide oder mikrobielle Lipide, können aber auch bestimmte Gruppen von Peptiden präsentieren. Menschen besitzen vier verschiedene CD1-Moleküle (CD1a – d) die in zwei verschiedene Untergruppen aufgeteilt werden: Die erste Untergruppe umfasst die Proteine CD1a – c, welche Glykolipide binden. CD1d, das Protein der zweiten Untergruppe, bindet als einziges Antigen  $\alpha$ -Galaktosylceramid. Auch die Präsentation ist auf eine bestimmte Gruppe von T-Zellen und NK-T-Zellen beschränkt (Banchereau et al., 2000; Sugita et al., 2000).

### 1.5 T-Zell-vermittelte Immunität

#### 1.5.1 Aktivierung naiver CD4- und CD8-T-Zellen

Nachdem die T-Zellen ihre Entwicklung im Thymus abgeschlossen haben, zirkulieren sie als naive T-Zellen zwischen Blut und Lymphorganen. Naive T-Zellen sind reife T-Zellen, die noch nicht auf ihr spezifisches Antigen gestoßen sind. Während ihrer Rezirkulation in die T-Zell-Regionen der Lymphgewebe tasten die T-Zellen die MHC/Peptid-Komplexe der DCs ab. Einerseits werden bei Erkennung von Selbst-MHC/Selbst-Peptid Überlebenssignale an die T-Zelle gesandt, zum anderen führt die Erkennung von MHC-präsentierten fremden Antigenen zur Aktivierung der T-Zelle.

Nur eine von  $10^4$  –  $10^6$  T-Zellen ist spezifisch für das präsentierte Antigen. Sobald eine T-Zelle ihr spezifisches Antigen erkennt, wird der Vorgang der Rezirkulation gestoppt und es kommt zur Differenzierung und Proliferation der T-Zelle. Die entstehenden Tochterzellen entwickeln sich zu bewaffneten T-Effektorzellen, die gegen bestimmte

Zielzellen gerichtet sind. Dieser Vorgang der Aktivierung und klonalen Vermehrung einer naiven T-Zelle nach ihrem ersten Zusammentreffen mit einem spezifischen Antigen wird als *T-Zell-Priming* bezeichnet und führt letztlich zur Entstehung der primären Immunantwort (Randolph, 2001). Die Auslösung der erworbenen Immunantwort findet also nicht am Ort der Infektion statt, sondern in den T-Zell-Regionen peripherer regionaler Lymphorgane, wohin die Antigene phagozytierter Pathogene oder ihrer Produkte von den DCs gebracht werden (Ingulli et al., 1997).

Die Erkennung des MHC/Peptid-Komplexes durch den TZR ist das „Signal 1“ in der DC-T-Zell-Interaktion. Weitere Wechselwirkungen finden über Adhäsionsmoleküle und kostimulierende Moleküle statt. Das für die T-Zell-Aktivierung notwendige „Signal 2“ wird über kostimulierende Moleküle auf der Oberfläche der DCs an ihre Liganden auf den T-Zellen übermittelt (McCoy et al., 1999). Die kostimulierenden Signale müssen dabei von derselben DC ausgehen, welche das spezifische Antigen präsentiert.

Die bekanntesten kostimulierenden Moleküle, die die klonale Vermehrung und Differenzierung von T-Zellen stimulieren, sind die beiden Glykoproteine CD80 und CD86, deren Ligand CD28 auf T-Zellen exprimiert wird (Caux et al., 1994b; Inaba et al., 1994). Die Aktivierung einer naiven T-Zelle führt zur Expression weiterer Proteine auf ihrer Oberfläche, welche die kostimulierenden Signale erhalten und modifizieren. Die Wechselwirkung zwischen CD40-L, das auf T-Zellen exprimiert wird, und CD40, das auf reifen DCs exprimiert wird, führt einerseits zur weiteren Aktivierung und Proliferation der T-Zelle, andererseits aber auch zu einer reziproken Stimulation der DC (Bennett et al., 1998) mit vermehrter Expression kostimulierender Moleküle und Sekretion immunstimulatorischer Zytokine (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-12) (Ridge et al., 1998; Schoenberger et al., 1998).

Bei Interaktion der kostimulierenden Moleküle CD80 und CD86 mit ihrem anderen Liganden CD152, der nur auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird, kommt es zur Aussendung inhibitorischer Signale, welche die Tochterzellen der T-Zellen unempfindlicher gegenüber weiterer Stimulation machen. Die Sekretion des autokrinen Wachstumsfaktors der T-Zellen, IL-2, wird beschränkt und die proliferative Phase der T-Zell-Antwort wird beendet (McCoy et al., 1999). Die Kommunikation zwischen DC und T-Zelle kann also als Dialog mit gegenseitiger Beeinflussung verstanden werden.

### 1.5.2 Induktion der peripheren T-Zell-Toleranz

In Abhängigkeit von ihrem Aktivierungsgrad sind DCs nicht nur in der Lage eine spezifische T-Zell-Immunantwort zu initiieren, sondern auch Toleranz gegenüber dem präsentierten Antigen zu induzieren (Dhodapkar et al., 2001). Toleranz wird als Folge eines Selektionsprozesses im Thymus erzeugt, der nur T-Zellen mit TZRs zulässt, die mit geringer Affinität an die eigenen MHC-Moleküle binden (positive Selektion), jedoch Rezeptoren ausschließt, die spezifisch für MHC/Selbst-Peptid Komplexe sind (negative Selektion) (Barton et al., 2002; Laufer et al., 1996). Die diesen Selektionsprozess überstehenden Zellen sind spezifisch für Fremd-Peptide, präsentiert durch die eigenen MHC-Moleküle, und damit MHC-restringiert. Verantwortlich für die negative Selektion sind Thymus-DCs (Brocker et al., 1997).

Doch nicht alle Peptide von Proteinen, die aus spezialisierten Geweben (z.B. Pankreas) stammen, werden im Thymus präsentiert. Deshalb müssen auch DCs in der Peripherie die Fähigkeit besitzen, Toleranz gegenüber körpereigenen Peptiden zu fördern (Kurts et al., 1997a; Kuwana et al., 2001). Wie oben beschrieben wird die Induktion einer adaptiven Immunantwort erst dadurch erreicht, dass T-Zellen, die ihr spezifisches Antigen auf der DC im MHC-Kontext erkennen (Signal 1) durch kostimulierende Moleküle der DC aktiviert werden (Signal 2) (Heath et al., 2001; Shortman et al., 2001). Die kostimulierenden Moleküle werden nur auf voll ausgereiften DCs exprimiert, die durch Aufnahme körperfremder Antigene stimuliert wurden. Unreife DCs liefern der T-Zelle lediglich das spezifische Antigen (Signal 1) ohne adäquate Kostimulation (Signal 2), so dass Toleranz bzw. Anergie gegenüber diesem Antigen induziert wird (Dhodapkar et al., 2001). Die Fähigkeit der DCs mittels ihrer kostimulierenden Eigenschaften über Anergie und Toleranz zu entscheiden, rückt die DCs in den Mittelpunkt der erworbenen Immunität.

Eine zentrale Rolle spielt die Induktion der Toleranz in der Unterscheidung zwischen physiologischem (apoptotischem) und verletzungsbedingtem (nekrotischem) Zelltod. So bringen nekrotische Zellen DCs zur Ausreifung, während apoptotische Zellen keine Aktivierung auslösen, obwohl in beiden Situationen antigene Bestandteile von DCs prozessiert und T-Zellen präsentiert werden (Gallucci et al., 1999; Steinman et al., 2000). Eine Ursache der Unterscheidung liegt in der unterschiedlichen Präsentation

des Antigens. Im Falle des nekrotischen ungeordneten Zelltodes, werden Zellinhalte, die im Normalfall das Innere der Zelle nicht verlassen (Desoxyribonukleinsäure (DNA), Ribonukleinsäure (RNA), Adeninnucleotide), frei und können als Gefahrensignale wirken, die die Ausreifung der DC stimulieren und die Expression kostimulierender Signale fördern. Im Falle des physiologischen apoptotischen Zelluntergangs kommt es möglicherweise aufgrund fehlender Gefahrensignale nicht zur Aktivierung der DC und damit zur Anergie der T-Zellen (Matzinger, 1998).

### 1.5.3 Aktivierung von T-Effektorzellen

T-Zellen werden durch ihre Interaktion mit APCs aktiviert und zur Proliferation und Differenzierung in T-Effektorzellen angeregt. Außerdem wird die Sekretion von IL-2, einem autokrin wirksamen Wachstumsfaktor für T-Zellen, stimuliert und somit die Proliferation weiter unterstützt. CD8-T-Zellen benötigen zu ihrer Aktivierung stärkere kostimulierende Signale als CD4-T-Zellen. DCs sind die einzigen APCs, die auch alleine potent genug sind CD8-T-Zellen zu aktivieren (Mehta-Damani et al., 1994). Makrophagen und B-Zellen benötigen dazu die Hilfe von CD4-T-Zellen, da sie nur wenige kostimulierende Moleküle auf ihrer Oberfläche tragen. Erkennen eine CD4-T-Zelle und eine CD8-T-Zelle auf der Oberfläche derselben APC verwandte Antigene, so kommt es durch Wechselwirkung zwischen CD40-L auf der CD4-T-Zelle und CD40 auf der APC zur vermehrten Expression von kostimulierenden Molekülen, so dass die APC besser in der Lage ist, die CD8-T-Zelle zu aktivieren (Ridge et al., 1998; Schoenberger et al., 1998).

Verschiedene funktionelle Gruppen von T-Effektorzellen sind bekannt:

- (1) Zytotoxische T-Zellen: CD8-T-Zellen werden durch MHC-I-tragende APCs aktiviert und differenzieren zu zytotoxischen T-Zellen, deren Aufgabe darin besteht, infizierte Körperzellen durch Lyse abzutöten.

CD4-T-Zellen werden durch MHC-II-exprimierende APCs aktiviert und können abhängig vom umgebenden Zytokinprofil und vom präsentierten Antigen in unterschiedliche Subtypen differenzieren:

- (2)  $T_H1$ -Zellen: Werden Antigene präsentiert, die sich in großen Mengen in intrazellulären Vesikeln ansammeln, so kommt es eher zu einer  $T_H1$ -Antwort. Diese hat durch die Aktivierung keimtötender Eigenschaften von Makrophagen eine effektivere Zerstörung intrazellulärer Mikroorganismen zur Folge. Außerdem werden stark opsonisierende Antikörper gebildet.
- (3)  $T_H2$ -Zellen: Präsentation endozytotisch aufgenommener extrazellulärer Antigene bewirkt bei CD4-T-Zellen eher eine Differenzierung zu  $T_H2$ -Zellen. Hierdurch wird vor allem die humorale Komponente der Immunantwort aktiviert: Durch die Stimulation Antigen-spezifischer naiver B-Zellen werden vermehrt IgM-Antikörper gebildet. Anschließend kommt es auch zur vermehrten Sekretion weiterer Immunglobulin-Isotypen.

Das Profil der sezernierten Zytokine ist innerhalb der drei Untergruppen der Effektorzellen sehr unterschiedlich und mit verantwortlich für die verschiedenen Wirkmechanismen (Tabelle 3).

T-Lymphozyten sind die Effektorzellen des Immunsystems, die Pathogene spezifisch erkennen und zerstören und somit die Integrität des menschlichen Körpers bei der Abwehr von Fremdstoffen aufrechterhalten. In ihrer Funktion unterstehen die T-Zellen jedoch der Kontrolle der DCs, da sie nur bereits prozessierte und präsentierte Antigene erkennen können. DCs sind in der Lage, Pathogene für T-Zellen „sichtbar“ zu machen, sie durch kostimulierende Moleküle zu aktivieren und damit primäre Immunantworten hervorzurufen. Als Mittler zwischen angeborener und erworbener Immunität rücken DCs in den Mittelpunkt des menschlichen Abwehrsystems.

## 1.6 Tumorimmuntherapie mit dendritischen Zellen

Aufgrund der zentralen Rolle, die DCs im humanen Immunsystem spielen, wird angenommen, dass sie entscheidend an der Entstehung einiger klinisch-immunologischer Krankheitsbilder beteiligt sind. Deshalb stellen sie die idealen

Kandidaten für klinische Immuntherapie dar. Ein Beispiel hierfür ist die Immuntherapie maligner Tumoren mittels DC-Vakzinierung.

T-Zell-Subtyp	Zytokin	Wirkung
Zytotoxische CD8-T-Zellen	IFN- $\gamma$	Aktivierung der MHC-Expression auf APC; Hemmung des Wachstums von T <sub>H</sub> 2-Zellen
	TNF- $\alpha$	Aktivierung von Makrophagen
Makrophagenaktivierende T <sub>H</sub> 1-Zellen	GM-CSF	Bildung von Makrophagen, Granulozyten und DCs; Aktivierung von Makrophagen und Differenzierung zu DCs
	IFN- $\gamma$	s. o.
	TNF- $\alpha$	s. o.
B-Zell-aktivierende T <sub>H</sub> 2-Zellen	IL-3	Wachstumsfaktor für Vorläufer hämatopoetischer Zellen (multi-CSF)
	IL-4	Aktivierung von B-Zellen; Wachstum und Überleben von T-Zellen
	IL-5	Wachstum und Differenzierung Eosinophiler
	IL-3	s. o.
	GM-CSF	s. o.
	IL-10	Hemmung der T <sub>H</sub> 1-Antwort; Hemmung der Reifung von DCs; Blockade des MHC-II-Transports zur Oberfläche
	TGF- $\beta$	Hemmung der Makrophagenaktivierung

**Tabelle 3:** T-Effektorzellen und ihr Zytokin-Sekretionsprofil.

Das Immunsystem besitzt grundsätzlich die Fähigkeit, neoplastische Zellen zu erkennen und zu zerstören. Dies konnte anhand spontaner Remissionen beim Nierenzellkarzinom und malignen Melanom nachgewiesen werden (Timmerman et al., 1999). Die Immunantwort gegen Tumoren kann durch das angeborene Immunsystem in Gang gesetzt und durch das erworbene Immunsystem weiter entwickelt werden.

Banchereau stellte folgende Hypothese zur zentralen Rolle der DCs in der Abwehr von Tumorzellen auf (Banchereau et al., 2000): Tumormoleküle müssen zunächst von unreifen DCs erkannt werden. Dies könnte über Erkennung von PAMPs auf der Oberfläche von Tumorzellen durch DCs geschehen. Dadurch kommt es zur Aktivierung verschiedener Effektorzellen der angeborenen Immunität (z.B. Makrophagen, NK-Zellen) durch DCs, die ihrerseits die Tumorzellen abtöten. Folglich werden Tumor-assoziierte Antigene (TAAs) freigesetzt, die von unreifen DCs aufgenommen und prozessiert werden. Daraufhin differenzieren unreife DCs zu reifen Antigen-präsentierenden DCs, die selektiv TAA-spezifische T-Zellen aktivieren können. Aktivierte CD8-T-Zellen töten die Tumorzellen direkt ab. Aktivierte CD4-T-Zellen unterstützen die Aktivierung weiterer Immunzellen wie B-Zellen, Eosinophile und Makrophagen.

Tumorzellen könnten an jeder Stelle der gegen sie gerichteten Immunantwort eingreifen und diese blockieren. So wurde gezeigt, dass die Freisetzung bestimmter Zytokine durch Tumoren, wie IL-6, IL-10 und *vascular endothelial growth factor* (VEGF), die Differenzierung und die Antigen-präsentierenden Eigenschaften der DCs unterdrückt (Bell et al., 1999; Gabilovich et al., 1996). Werden Tumor-assoziierte DCs aus dem peripheren Blut oder aus Metastasen isoliert, weisen sie meist geringe Expression kostimulierender Moleküle und damit reduzierte allostimulatorische Kapazität auf, was darauf schließen lässt, dass Tumoren die volle Funktionsfähigkeit von DCs behindern. Außerdem ist IL-10, das von vielen Tumorzellen sezerniert wird, in der Lage die Entwicklung von Toleranz von DCs gegenüber Tumorgewebe zu unterstützen (Enk et al., 1997).

Andererseits sind DCs aufgrund ihrer einzigartigen Fähigkeit zur Induktion primärer Immunantworten die optimalen Kandidaten für eine potentielle Tumorstoffimpfung. Werden Patienten-eigene DCs außerhalb des Körpers mit TAA beladen und dann reinjiziert, entsteht spezifische Immunität gegen den Tumor. Es gibt bereits vielversprechende Studien, die bestätigen, dass mit TAAs beladene DCs sowohl im Tiermodell (Celluzzi et al., 1996) als auch im Menschen (Nestle et al., 1998; Thurnher et al., 1997) protektive Immunantworten gegen Tumoren induzieren können. Zur Tumorstoffimpfung mittels DC-Vakzinierung ist es notwendig ein Protokoll zu entwerfen, mit welchem in kurzer Zeit und kostengünstig, eine große Anzahl stabiler und funktionstüchtiger DCs generiert werden kann.

Mit dem bisherigen Standard-Protokoll können zwar große Mengen stabiler und funktionstüchtiger DCs gewonnen werden, im klinischen Alltag ist dieses Protokoll jedoch zeitaufwendig und kostspielig. Deshalb war es unser Ziel eine Methode zu etablieren mit der phänotypisch und funktionell mit Standard-moDCs vergleichbare stabile DCs in kürzerer Zeit und mit einfacherer Durchführbarkeit generiert werden können.

## 2. Material & Methoden

### 2.1 Reagenzien und Geräte

#### 2.1.1 Geräte

Begasungsbrutschrank:	Heraeus (Hanau, D)
Eismaschine:	Ziegra (Isernhagen, D)
ELISA Reader:	Dynatech (Guernsey, Channel Islands, UK)
FACSCalibur:	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
<i>MicroCell Harvester:</i>	<i>Skatron (Ismaning, D)</i>
Betaplate Liquid Scintillation Beta Counter:	Wallac (Turku, SF)
MACS:	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
pH-Meter:	WTW (Weilheim, D)
Phasenkontrastmikroskop (Axiovert):	Zeiss (Jena, D)
Rasterelektronenmikroskop JSM-35CF:	JEOL (Tokio, J)
Zentrifuge Sepatech Omnifuge:	Heraeus (München, D)
Zentrifuge 5417R:	Eppendorf (Hamburg, D)
Zytospin 3:	Shandon (Frankfurt, D)
Vortexer:	Janke & Kunkel (Staufen, D)
Waage (SBC 21):	Fa. Scaltec Instruments (Heiligenstadt, D)

#### 2.1.2 Reagenzien

##### *Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterial*

Dimethylsulfoxid (DMSO):	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Ortho-mune Lyse-Reagenz:	Ortho-Clinical Diagnostics (Neckarsgönd, D)
Heparin-Natrium:	Ratiopharm (Ulm, D)
Natrium-Chlorid (NaCl) 0,9 %:	Baxter (Lessines, B)

Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA):	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Glutardialdehyd 25 %:	Merck (Darmstadt, D)
Ethanol absolut zur Analyse:	Merck (Darmstadt, D)
Pluronic F-127:	Molecular Probes (Leiden, NL)
Fluo-3:	Molecular Probes (Leiden, NL)
Fura Red:	Molecular Probes (Leiden, NL)
FITC-Dextran:	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Kalzium-Ionomycin:	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Tetanus-Toxoid-Protein (TT):	Statens Serum Institute (Copenhagen, DM)
Trypanblau:	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Szintillationsflüssigkeit für Beta-Counter (Betaplate Scint):	Wallac (Cambridge, UK)
FACSFlow:	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
FACSSafe:	Becton Dickinson (Heidelberg, D)

#### *Radioaktive Chemikalien*

[ <sup>3</sup> H]-Thymidin:	Amersham Buchler (Freiburg, D)
-----------------------------	--------------------------------

#### *Reagenziensätze*

##### **Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs):**

Gesamt-IL-12 (IL-12p40 + p70):	BenderMedSystems (Wien, A)
IL-12p70 ELISA Kit:	OptEIA PharMingen (San Diego CA, USA)
IL-4 ELISA Kit:	OptEIA PharMingen (San Diego CA, USA)
IFN- $\gamma$ ELISA Kit:	OptEIA PharMingen (San Diego CA, USA)

##### **Magnetic activated cell sorting (MACS):**

Pan T Cell Isolation Kit:	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD45RO MicroBeads:	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD14 MicroBeads:	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)

*Antikörper*

Folgende Antikörper wurden in der vorliegenden Arbeit zur Durchflusszytometrie verwendet:

<b>Name</b>	<b>Spezifität</b>	<b>Klon</b>	<b>Fluoreszenz (bei FACS-AK)</b>	<b>Herkunft</b>
Anti-CD45RA	CD45RA	HI100	PE	BD PharMingen
Anti-HLA-DR, DP, DQ	HLA-DR	TÜ39	FITC	BD PharMingen
Anti-CD83	CD83	HB15e	FITC	BD PharMingen
Anti-CD40	CD40	5C3	PE	BD PharMingen
Anti-CD80	CD80	L307.4	PE	BD PharMingen
Anti-CD86	CD86	2331/FUN-1	APC	BD PharMingen
Anti-CD14	CD14	M5E2	APC	BD PharMingen
Anti-CD1a	CD1a	HI149	PE	BD PharMingen
Anti-CD3	CD3	HIT3A	FITC	BD PharMingen
Anti-CD4	CD4	RPA-T4	PE	BD PharMingen
Anti-CD8	CD8	RPA-T8	APC	BD PharMingen
Anti-CCR7	CCR7	3D12		R. Förster
Anti-rat IgG <sub>2a</sub>	Ratte IgG <sub>2a</sub>	RG7/1.30		BD PharMingen
Streptavidin-APC	Streptavidin	-	APC	BD PharMingen

**Tabelle 4:** Verwendete monoklonale FACS-Antikörper.

*Materialien für die Zellkultur*

RPMI 1640 Medium:

Biochrom (Berlin, D)

Humanes AB-Serum:	BioWhittaker (Wakersville, USA)
Humanes Serum Albumin (HSA):	Pharmacia & Upjohn (Erlangen, D)
Fötale Kälberserum (FCS):	Fa. GibcoBRL (Paisley, UK)
Biocoll Separationsmedium:	Biochrom (Berlin, D)
Penicillin:	Sigma (München, D)
Streptomycin:	Sigma (München, D)
L-Glutamin:	Life Technologies (Paisley, UK)
<i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS):	PAA (Linz, A)

Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Greiner (Frickenhausen, D), Falcon (Heidelberg, D), Becton Dickinson (Le Pont de Claix, F), Bibby Sterilin (Stone, Staffordshire, UK) und Corning (Corning NY, USA) bezogen.

#### *Zytokine und Wachstumsstimulatoren*

GM-CSF:	Novartis (Basel, CH)
Interleukin-4:	Promega (Madison, WI, USA)
TNF- $\alpha$ :	R&D Systems (Wiesbaden, D)
Interleukin-1 $\beta$ :	Strathmann Biotech (Hannover, D)
Interleukin-6:	Amersham (Buckinghamshire, UK)
PGE <sub>2</sub> :	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Interferon- $\gamma$ :	Strathmann Biotech (Hannover, D)
Interleukin-2:	Strathmann Biotech (Hannover, D)
Interleukin-7:	Strathmann Biotech (Hannover, D)
Löslicher CD40-Ligand:	Immunex (Seattle, WA, USA)

#### *Chemokine*

6Ckine:	R&D Systems (Wiesbaden, D)
MIP-1 $\alpha$ :	R&D Systems (Wiesbaden, D)
<i>stromal cell-derived factor</i> (SDF) 1:	R&D Systems (Wiesbaden, D)

#### *Häufig verwendete Puffer, Lösungen und Medien*

##### **RPMI-Vollmedium:**

RPMI-Medium

2 % vol humanes AB Serum

100 IU/ml Penicillin

100  $\mu$ g/ml Streptomycin

2 mM Glutamin

**Einfriermedium:**

85 % vol humanes AB-Serum

10 % vol DMSO

5 % vol Glucose

**MACS-Puffer:**

PBS

0,5 % vol HSA

2 mM EDTA

pH = 7,2

**Erythrozyten-Lysepuffer:**

Ortho-mune Lyse-Reagenz

in PBS

## 2.2 Zellisolation und Zellkultur

### 2.2.1 Zellkulturen

Die Zellkultur erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C und 95 % Luftfeuchtigkeit bei einem Anteil von 5 % CO<sub>2</sub> in der Atmosphäre. Als Kulturmedium wurde stets Vollmedium verwendet.

### 2.2.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde der Trypanblau-Ausschlußtest durchgeführt. Lebende Zellen schließen den Farbstoff aus, tote Zellen werden blau gefärbt. Die Zellzahl wurde nach geeigneter Verdünnung der Zellsuspension in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ermittelt.

### 2.2.3 Gewinnung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Die Isolation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut (PBMZ) erfolgte mittels Dichtezentrifugation mit Ficoll (Bender et al., 1996). Dazu wurde heparinisiertes (50 I.E Na-Heparin/ml Blut) venöses Vollblut gesunder freiwilliger Probanden verwendet. 50 ml Vollblut wurden unter sterilen Bedingungen mit Perfusorspritzen gewonnen, auf zwei sterile 50 ml Leucosep-Röhrchen aufgeteilt und im Verhältnis 1:2 mit 0,9 %iger Natrium-Chlorid-Lösung (NaCl) verdünnt. Je 30 ml des verdünnten Blutes wurden in sterilen 50ml Leucosep-Röhrchen auf 15 ml Biocoll (=Ficoll) geschichtet und bei 1000g ohne Bremse für 20 Minuten (min) zentrifugiert.

Ficoll ist ein polysaccharidähnliches Makromolekül, das aufgrund seiner spezifischen Dichte von 1.077 g/ml die Eigenschaft besitzt, in einer Dichtezentrifugation PBMZ an der Phasengrenze zwischen Blutserum und Ficoll anzureichern. Erythrozyten und Granulozyten durchwandern aufgrund ihrer höheren Dichte die Ficollschicht und sedimentieren, Thrombozyten verweilen aufgrund ihrer geringen Dichte im Serum oberhalb der Ficollschicht.

Der PBMZ-Ring in der Interphase wurde vorsichtig – in möglichst kleinem Volumen, um wenig Ficoll mit aufzunehmen – mit einer Pipette aspiriert. Anschließend wurden die Zellen in ein neues 50ml Leucosep-Röhrchen überführt, das mit NaCl aufgefüllt wurde, und für 15 min bei 520g zentrifugiert, um die restlichen Plasmabestandteile von den Zellen zu trennen. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen zweimal in 0,9 %iger NaCl gewaschen (Zentrifugation 10 min bei 300 g und 4° C), bevor sie in 5 ml Ortholyse-Reagenz aufgenommen und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Nach der erfolgten Lyse der verbliebenen Erythrozyten wurden die Zellen erneut gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in Vollmedium aufgenommen und nach Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Kammer auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

## 2.2.4 Monozytenanreicherung aus PBMZ

PBMZ setzen sich vorwiegend aus Monozyten und Lymphozyten zusammen. Zur Anreicherung der Monozyten wurden PBMZ zunächst nach der oben beschriebenen Methode gewonnen, anschließend wurde nach einem der folgenden Protokolle vorgegangen:

### 2.2.4.1 Aufreinigung mittels Adhärenzschritt

Die aus 50 ml Vollblut gewonnenen PBMZ wurden in 20 ml Vollmedium aufgenommen (Zell-Konzentration: 2 bis  $3 \times 10^6$ /ml) und in einer 550 ml ( $175 \text{ cm}^2$ ) Kulturflasche für 1 h im Brutschrank inkubiert. Dabei wurde die Eigenschaft der Monozyten zur Adhärenz am Boden der Kulturflasche genutzt, um diese anzureichern. Nach 1 h wurden die nicht-adhären Zellen durch Abpipettieren des Mediums entnommen und entweder verworfen oder für weitere Experimente aufbewahrt.

Um die Reinheit der adhären Monozyten zu erhöhen, wurde die Kulturflasche nach Zugabe von 20 ml raumwarmer gepufferter Kochsalzlösung (PBS = *Phosphate-buffered saline*) horizontal geschwenkt und anschließend das PBS verworfen. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Hierauf wurden die Monozyten in 20 ml Vollmedium für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeitspanne lösten sich die initial adhären Monozyten wieder vom Boden der Kulturflasche und konnten somit leicht geerntet werden (Turner et al., 1999). Das an Monozyten reiche Medium wurde in ein 50 ml Leucosep-Röhrchen überführt. Die wenigen noch adhären Monozyten wurden mit Hilfe eines Zellschabers gewonnen. Nach Zentrifugation des 50 ml Leucosep-Röhrchens für 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  und 300g wurde der Überstand dekantiert, die Zellzahl bestimmt und das Zellpellet mit Vollmedium so resuspendiert, dass die Zellkonzentration 0,75 bis 1,5 Mio. Zellen/ml Vollmedium betrug.

#### 2.2.4.2 Aufreinigung mittels magnetischer Zellseparation

Zur magnetischen Zellseparation (MACS = *magnetic activated cell sorting*) wurden die Zellen in einen Puffer aufgenommen, der sich aus PBS (pH 7,2), 0,5 % HSA und 2 mM EDTA zusammensetzt (MACS-Puffer). PBMZ wurden durch Dichtezentrifugation mit Ficoll gewonnen.  $10^7$  Zellen wurden in 80  $\mu$ l MACS-Puffer resuspendiert und mit Magneten-gekoppelten CD14-Antikörpern, sog. CD14 *MicroBeads*, nach Angaben des Herstellers markiert. PBMZ wurden zunächst durch einen 40  $\mu$ m Nylonfilter von Zellklumpen befreit und für 15 min mit CD14 *MicroBeads* bei 8 – 12°C inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde die Zellsuspension in eine in einem Magnetfeld stehende Selektionssäule appliziert. Durch die magnetische Markierung wurden die Monozyten in der Säule zurückgehalten, während die unmarkierten Zellen die Säule passieren konnten (positive Selektion). Nach mehrmaligem Waschen der Selektionssäule mit MACS-Puffer wurde diese aus dem Magnetfeld herausgenommen und mit Druck die positiv selektionierte Zellfraktion der CD14<sup>+</sup> Monozyten mit Hilfe eines Stempels aus der Säule gespült. Die Reinheit der auf diese Weise erhaltenen Monozyten war immer > 95 %. Anschließend wurden die Monozyten für 10 min bei 4°C und 300g zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet in einer Konzentration von 0,75 bis 1,5 Mio. Zellen/ml in Vollmedium resuspendiert.

#### 2.2.5 Lymphozytenanreicherung aus PBMZ

Die Anreicherung der T-Lymphozyten aus PBMZ erfolgte ebenfalls über magnetische Zellseparation, wobei es sich in diesem Fall um eine negative Selektion der CD3<sup>+</sup> T-Zellen handelte, d. h. alle „Nicht-T-Zellen“ (B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, DCs, erythroide Vorläuferzellen, Thrombozyten und basophile Granulozyten) wurden depletiert.

Die Zellen wurden wie oben beschrieben in MACS-Puffer resuspendiert, durch einen 40  $\mu$ m Nylonfilter gedrückt und nach Angaben des Herstellers mit einem Cocktail aus Antikörpern markiert. Dazu wurden die PBMZ 15 min mit einer Mischung aus Hapten-gekoppelten Antikörpern gegen CD11b, CD16, CD19, CD36 und CD56 bei 8-12°C

inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen mit einem magnetisch markierter Anti-Hapten-Antikörper für weitere 15 min bei 8 – 12°C inkubiert. Bei der anschließenden Auftrennung in der Selektionssäule wurden alle markierten Zellen zurückgehalten. Die unmarkierten CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten dagegen konnten die Säule frei passieren und somit angereichert werden.

Die erhaltene Zellpopulation setzte sich sowohl aus CD45RA<sup>+</sup> naiven T-Zellen als auch aus CD45RO<sup>+</sup> Memory-T-Zellen zusammen. Um eine nur aus naiven T-Lymphozyten bestehende Population zu erhalten, wurde die Zellsuspension in einem zweiten Schritt mit CD45RO MicroBeads markiert (15 min bei 8 – 12°C) und auf diese Weise die CD45RO<sup>+</sup> Memory-T-Zellen positiv depletiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 300g wurden die T-Lymphozyten in Vollmedium, das geringe Konzentrationen an IL-2 (10 U/ml) enthielt, aufgenommen und in 6-well-Platten bei einer Konzentration von 2 bis 3 x10<sup>6</sup> Zellen/ml im Brutschrank kultiviert, bis sie für Kokultur-Experimente weiter verwendet wurden.

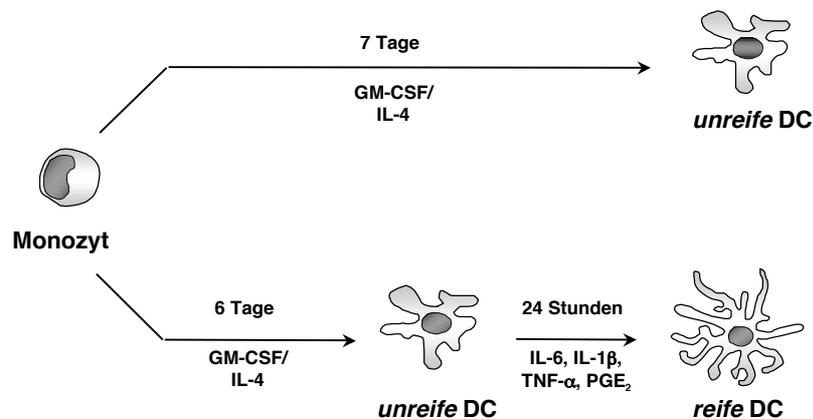
#### 2.2.6 Generierung dendritischer Zellen aus Monozyten *in vitro*

Monozyten wurden entweder durch Adhärenz oder magnetische Zellseparation gewonnen. Vor Kultivierung der Zellen wurde ihre Reinheit mittels durchflusszytometrischer Analyse überprüft. Die Generierung von DCs aus Monozyten erfolgte nach einem in der Literatur beschriebenen Standard-Protokoll (Romani et al., 1994; Sallusto et al., 1994). Alternativ wurden zwei neue Methoden erprobt.

##### 2.2.6.1 Standardmethode

Monozyten wurden in 6-well-Platten (0,5 bis 1,5 x10<sup>6</sup> Zellen/ml) für 7 Tage in Vollmedium zusammen mit 1000 U/ml GM-CSF und 500 U/ml IL-4 im Brutschrank inkubiert, um unreife DCs zu erhalten. Am Tag 6 wurde ein Teil der Zellen mit einer Kombination aus proinflammatorischen Mediatoren (1000 U/ml TNF- $\alpha$ , 10 ng/ml IL-1 $\beta$ , 10 ng/ml IL-6 und 1  $\mu$ M PGE<sub>2</sub>) stimuliert. Nach 24 – 48 h Inkubation im Brutschrank

konnten reife DCs geerntet werden. Die gewonnenen Monozyten-generierten DCs (moDCs) wurden im Rahmen der jeweiligen Fragestellung weiter verarbeitet (Abb. 2).



**Abbildung 2: Generierung reifer DCs aus Monozyten nach dem Standard-Protokoll (moDCs).** Monozyten wurden für 7 Tage mit GM-CSF und IL-4 inkubiert, um unreife DCs zu erhalten (oben). Um die Ausreifung der Zellen anzuregen, wurden die unreifen DCs am Tag 6 der Kultur mit GM-CSF und IL-4 mit einer Kombination aus proinflammatorischen Mediatoren (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und PGE<sub>2</sub>) stimuliert. Nach 24 h Stimulation wurden die reifen DCs geerntet (unten).

#### 2.2.6.2 Alternative Methoden

Es wurden zwei neue Protokolle erprobt:

Monozyten wurden in Vollmedium mit 1000 U/ml GM-CSF und 500 U/ml IL-4 resuspendiert ( $0,5$  bis  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml) und in 6-well-Platten ausgesät. Die Kombination aus proinflammatorischen Mediatoren (1000 U/ml TNF- $\alpha$ , 10 ng/ml IL-1 $\beta$ , 10 ng/ml IL-6 und  $1 \mu\text{M}$  PGE<sub>2</sub>) wurde nun entweder gleich zu Beginn der Kultur hinzugefügt oder erst nach 24 h Inkubation im Brutschrank. In beiden Fällen wurden die Zellen nach insgesamt 48 h Kultur geerntet und im Rahmen der jeweiligen Fragestellung weiterverarbeitet (s. Abb. 6).

In einigen Experimenten wurden die verschiedenen DC-Populationen für die letzten 12 h Kultur zusätzlich mit 500 ng/ml löslichem CD40-L Trimer oder 500 ng/ml CD40-L plus 1000 U/ml IFN- $\gamma$  stimuliert.

### *2.2.6.3 Einfrieren dendritischer Zellen*

Für Kokultur-Experimente mit DCs und T-Zellen wurde eine Teilpopulation der DCs für die Restimulation eingefroren (Feuerstein et al., 2000). Einfriermedium und Kryoröhrchen wurden bei 4°C vorgekühlt. Ca.  $1 \times 10^6$  DCs wurden in 500 µl Einfriermedium aufgenommen und für 30 min bei -20°C eingefroren. Nach weiteren 2 h bei -40°C wurden die Zellen in einen Gefrierschrank mit -80°C überführt. Am Tag der Restimulation wurden die DCs in warmem Vollmedium wieder aufgetaut.

## **2.3 Analyseverfahren**

### 2.3.1 Phasenkontrast- und Rasterelektronenmikroskopie

Zur routinemäßigen optischen Kontrolle des Kulturverlaufs wurde das Verfahren der Phasenkontrastmikroskopie verwendet, wobei die Morphologie der DCs täglich bei 10- bis 100-facher Vergrößerung beurteilt wurde.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Dr. U. Welsch (Anatomische Anstalt der LMU, München) durchgeführt. Die DCs wurden mit niedriger Umdrehungszahl (300g) im Zytospin auf Objektträger zentrifugiert und mit 2,5 %igem Glutaraldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen in einer aufsteigenden Alkoholreihe (25, 50, 75, 95, 100 % Ethanol) für jeweils 30 min entwässert. Das Trocknen erfolgte am kritischen Punkt von Kohlendioxid. Die Präparate wurden mit einer dünnen Goldschicht bedampft und anschließend im Rasterelektronenmikroskop in 4000 bis 6600-facher Vergrößerung dargestellt. Die Fotos wurden mittels Adobe Photoshop software (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA) gescannt.

### 2.3.2 *Enzyme-linked immunosorbent assay*

Der Zytokinnachweis in den Überständen verschiedener Kulturen wurde anhand von *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISAs) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Bestimmung von Gesamt-IL-12 erfolgte mit Hilfe eines fertigen ELISA-Kits, das sowohl IL-12p40 als auch IL-12p70 detektiert. Der Test beruht auf der Bindung der im Überstand der Zellkultur gelösten Zytokine an spezifische Antikörper, mit denen die Vertiefungen der ELISA-Platte beschichtet sind. Dazu wurde eine Standardreihe mit bekannter Proteinmenge und die zu untersuchenden Überstände in entsprechender Verdünnung aufgetragen. Nicht gebundenes Zytokin wurde durch Waschen entfernt. Gebundenes Zytokin wurde durch Zugabe eines Biotin-gekoppelten Antikörpers, der mit einem anderen Epitop reagierte, markiert. Als nächstes wurden die Proben mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase inkubiert, wobei die Streptavidin-Moleküle eine feste Bindung mit den Biotin-Molekülen eingehen. Die Meerrettichperoxidase katalysiert mit einem anschließend zugegebenen Farbstoff eine quantifizierbare Reaktion, die proportional zu der Menge des in der Probe vorhandenen Zytokins ist. Direkt nach Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure wird die durch den umgesetzten Farbstoff hervorgerufene Absorption bei der in der Anleitung empfohlenen Wellenlänge in einem ELISA-Reader gemessen. Die Auswertung erfolgte durch den Vergleich mit der Standardreihe.

Die Bestimmung von IL-12p70, IL-4 und IFN- $\gamma$  wurde mit ELISA-Kits zum Selbst-Beschichten durchgeführt. Dazu wurden die Vertiefungen von 96-well-Platten über Nacht mit Antikörpern gegen das zu messende Zytokin beschichtet. Zur Verhinderung von unspezifischen Bindungen wurde die Platte am nächsten Tag mit einem Blockierungsreagenz (FCS) geblockt, bevor die Proben und die Standardkurve in die Vertiefungen pipettiert wurden. Die weiteren Schritte und die Auswertung erfolgten nach dem oben beschriebenen Prinzip.

### 2.3.3 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die FACS-Analyse (FACS = *fluorescence-activated cell sorting*) dient der Charakterisierung verschiedener Zelltypen. Einerseits können Aussagen über Größe und Granularität der Zellen gemacht werden, andererseits können nach Markierung der Zellen mit entsprechenden Fluoreszenz-Farbstoff-gekoppelten Molekülen verschiedenste Messungen durchgeführt werden: Bestimmung der Dichte bestimmter Oberflächenmarker auf der Zellmembran, Bestimmung der Endozytoseaktivität und Messung intrazellulärer Zytokin- oder Kalziumkonzentrationen.

Die Zellsuspensionen werden in so großem Volumen aufgenommen, dass die Zellen in einem laminaren Flüssigkeitsstrom einzeln hintereinander durch die Kapillare des FACS-Geräts gesaugt werden. Durch einen Laserstrahl im Inneren des Gerätes wird das Chromophor der für die Oberflächenmarkierung verwendeten Antikörper zur Emission von Lichtquanten angeregt, die in Linsen gesammelt werden. Dabei trennen Filter das gesammelte Licht und lenken es nach Wellenlängenbereichen aufgetrennt zu verschiedenen Photodetektoren. So können Signale verschiedener Wellenlänge voneinander getrennt aufgenommen und analysiert werden (Mehrfarbenanalyse). Die gemessene Intensität der Fluoreszenz ist dabei proportional zur Zahl der pro Zelle gebundenen Antikörper gegen das untersuchte Oberflächenantigen.

Außerdem führen Zelleigenschaften wie Größe und intrazelluläre Granularität zu einer Lichtstreuung des einfallenden Laserstrahls, die durch je einen Photodetektor in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (Vorwärtsstreulicht = FSC) und einen im rechten Winkel dazu liegenden (Seitwärtsstreulicht = SSC) registriert und in elektrische Signale umgewandelt werden. Die Intensität des FSC wird im Wesentlichen durch die Zellgröße, die des SSC durch die intrazelluläre Granularität bestimmt.

#### 2.3.3.1 Nachweis der Expression von Oberflächenmolekülen

Zum Nachweis von charakteristischen Oberflächenmolekülen wurden die verschiedenen Zelltypen mit Fluoreszenz-Farbstoff-gekoppelten monoklonalen

Antikörpern (mAb) inkubiert, die gegen diese Oberflächenmoleküle gerichtet sind. Pro Ansatz wurden ca. 100.000 Zellen in einem FACS-Röhrchen in 100  $\mu$ l PBS mit 5 % FCS aufgenommen und auf Eis gelagert. Zur Färbung wurden die Zellen für 30 min bei 4°C unter Lichtausschluss mit FITC-, PE- oder APC-gekoppelten Antikörpern (je 3,5  $\mu$ l/Tube) inkubiert (siehe Tabelle 4), um eine Bindung der Antikörper an die entsprechenden Oberflächenmoleküle der Zellmembran zu ermöglichen. Überschüssige Antikörper wurden durch einen Waschschrift entfernt: nach Zugabe von 3 ml PBS wurden die Zellen für 7 min bei 400g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand sofort dekantiert und die Zellen für die FACS-Messung in 150-250  $\mu$ l PBS resuspendiert.

Im Gegensatz zu der hier beschriebenen direkten Immunfluoreszenz, bei der Fluorochrom-gekoppelte Antikörper verwendet werden, die direkt an Oberflächenmoleküle binden, erfolgte die Bestimmung der Expression von CCR7 mit dem Verfahren der indirekten Immunfluoreszenz. Hierbei wurden die Zellen (200.000 Zellen in 100 $\mu$ l PBS mit 5 % FCS) zunächst mit einem unmarkierten Antikörper (50  $\mu$ l/ml rat anti-CCR7 mAb) für 15 min bei 4°C inkubiert. Darauf folgte ein Inkubationsschritt mit einem biotinylierten Antikörper (2  $\mu$ g/ml anti-rat IgG2a-biotinylated mAb), der gegen den Fc-Teil des ersten Antikörpers gerichtet war. In einem letzten Schritt wurden die Zellen mit Streptavidin-APC (0,4  $\mu$ g/ml), einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper, bei dem das Streptavidin-Molekül zur Bindung an Biotin diente, gefärbt. Zwischen den Inkubationsschritten wurden die Zellen jeweils mit 3 ml PBS für 7 min bei 400g und 4°C gewaschen.

Die Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen wurde auf einem FACSCalibur Durchflusszytometer gemessen. Zur Auswertung der Daten wurde CellQuest- (Becton Dickinson, Version 3.2.1) und FlowJo- (Tree Star, San Carlos, CA, Version 2.7.8) Software verwendet.

### *2.3.3.2 Intrazelluläre Kalziummessung zum Nachweis von Chemokinrezeptoren*

Wie bereits beschrieben wird durch die Bindung von Chemokinen an ihre Rezeptoren auf der Zellmembran von DCs eine Signaltransduktionskette in Gang gesetzt, an deren

Ende die Freisetzung von Kalzium aus den intrazellulären Speichern steht. Mit einer Methode zur Messung der intrazellulären Kalzium-Konzentration kann somit nach Zugabe eines Chemokins zu DCs das Vorhandensein und die Funktionsfähigkeit von Chemokinrezeptoren auf deren Oberfläche nachgewiesen werden.

DCs wurden in Vollmedium ( $10^6$  Zellen/ml) mit den Kalzium-sensitiven Farben Fluo-3 ( $4 \mu\text{M}$ ) und Fura Red ( $10 \mu\text{M}$ ) in Gegenwart eines Detergenz (0,02 % Pluronic F-127) für 40 min im Brutschrank inkubiert (Novak et al., 1994). Anschließend wurde überschüssiger Farbstoff durch zweimaliges Waschen der Zellen in Vollmedium (Zentrifugation für 7 min bei 300g und  $4^\circ\text{C}$ ) entfernt. Zur FACS-Analyse wurden die Zellen in Vollmedium in einer Konzentration von 400.000 Zellen/ml resuspendiert. Je  $250 \mu\text{l}$  der Zellsuspension wurden in ein FACS-Röhrchen pipettiert und für 5 min im warmen Wasserbad auf eine Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  erwärmt. Anschließend wurden jeweils getrennt die Chemokine MIP-1  $\alpha$  (500 ng/ml), 6CKine (500 ng/ml) und SDF-1 (250 ng/ml) zugegeben, um die Chemokinrezeptoren zu aktivieren. Die Zugabe von Kalzium-Ionomycin diente als Positivkontrolle. Veränderungen der intrazellulären Kalzium-Konzentration wurden im Durchflusszytometer pro Zeiteinheit (zeitliche Auflösung 200 Millisekunden) bestimmt. Um das Signal besser sichtbar zu machen, wurde der Quotient der Fluoreszenzintensität von Fluo-3, das eine erhöhte Fluoreszenz in Gegenwart von Kalzium zeigt, und Fura Red, das eine erniedrigte Fluoreszenz in Gegenwart von Kalzium zeigt, betrachtet.

#### *2.3.3.3 Bestimmung der Endozytoseaktivität mittels FITC-Dextran*

Die endozytotische Aktivität der DCs wurde über die Messung der Aufnahme von FITC-konjugierten Dextran-Molekülen bestimmt. Die DCs (500.000 Zellen/ml Vollmedium) wurden hierzu für 2 h mit FITC-Dextran (0,5 mg/ml) bei  $37^\circ\text{C}$  im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges, nicht phagozytiertes Dextran durch intensives Waschen (zweimalige Zentrifugation für 7 min bei 400g und  $4^\circ\text{C}$ ) der Zellen entfernt. Zur FACS-Analyse wurden die Zellen in PBS resuspendiert. Die FITC-Dextran-Aufnahme wurde als *mean fluorescence intensity* (MFI) im FACS quantifiziert. Das an Dextran gekoppelte FITC-Molekül sollte sich dabei lediglich in jenen Zellen wieder finden, in die es durch rezeptorvermittelte Endozytose gelangt war.

Unspezifische Bindung von FITC-Dextran an die Oberfläche der DCs wurde durch Vergleich mit auf Eis inkubierten Zellen berücksichtigt, bei denen keine Endozytoseaktivität vorhanden ist.

### 2.3.4 Analyse der T-Zell-stimulierenden Eigenschaften dendritischer Zellen

#### 2.3.4.1 Antigenbeladung dendritischer Zellen

Um die T-Zell-stimulierenden Fähigkeiten der unterschiedlichen DC-Typen (Standardmethode vs. alternative Methode) zu überprüfen, wurden autologe Kokulturen zwischen DCs und T-Zellen untersucht.

Im Folgenden werden zwei Methoden vorgestellt, bei denen unreife DCs, reife DCs und Antigen-beladene reife DCs miteinander verglichen wurden. Dazu mussten die verschiedenen DC-Typen mit Antigen beladen werden. Als Modell-Antigen diente Tetanus-Toxoid-Protein (TT). Unreife moDCs, die nach der Standardmethode generiert wurden, wurden an Tag 5 der Kultur mit TT (5mg/ml) inkubiert. Alternativ wurden Monozyten, die mit GM-CSF und IL-4 inkubiert wurden, bereits zu Beginn ihrer Kultur mit TT (5mg/ml) inkubiert. Nach 24 h Inkubation mit dem Antigen wurden beide Zelltypen mit proinflammatorischen Mediatoren stimuliert. Bereits nach 12 h Stimulation, je nach Generierungsprotokoll am 6. oder 2. Kulturtag, wurden die Zellen geerntet und wie im folgenden beschrieben mit autologen T-Zellen kokultiviert.

#### 2.3.4.2 Autologe Kokultur dendritischer Zellen mit T-Zellen

Unreife DCs, reife unbeladene DCs und reife Antigen-beladene DCs wurden mit autologen T-Zellen im Verhältnis 1:10 (50.000 DC : 500.000 T-Zellen) in 48-well-Platten kokultiviert. Die Kultur erfolgte in Vollmedium unter Zugabe von löslichem CD40-L (500 ng/ml), IL-2 (25 U/ml) und IL-7 (10 ng/ml). Jeden zweiten Tag wurde die Hälfte des Mediums durch frisches Vollmedium, versetzt mit 25 U/ml IL-2 und 10 ng/ml IL-7, ersetzt. Am 10. Tag der Kokultur wurden die T-Zellen mit aufgetauten DCs unter

Zugabe von CD40-L, IL-2 und IL-7 im Verhältnis 10:1 restimuliert. Die Restimulation erfolgte mit denjenigen DCs (unreife DCs, reife unbeladene DCs bzw. reife Antigen-beladene DCs), mit denen die T-Zellen auch zu Beginn der Kokultur stimuliert worden waren. Nach 4 h Restimulation wurden die Kulturüberstände abgenommen und zur Zytokinbestimmung mittels ELISA verwendet.

#### *2.3.4.3 Messung der proliferativen T-Zell-Antwort mit [<sup>3</sup>H]-Thymidin*

Die Messung der proliferativen T-Zell-Antwort wurde in Kooperation mit Prof. Dr. R. Wank (Immunologisches Institut, LMU, München) durchgeführt.

Zunächst soll das Prinzip des radioaktiven Proliferationsassays kurz erklärt werden: Zur Messung von Zellproliferationsraten werden die zu untersuchenden Zellen mit radioaktiv markiertem [<sup>3</sup>H]-Thymidin beladen, welches von den Zellen während der Proliferation in die DNA eingebaut wird. Je nach Zelltyp werden nach einer bestimmten Inkubationszeit die Zellen auf eine Filtermatte geerntet und die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Thymidin in die Zellen wird in einem Szintillations-Zähler gemessen. Die Menge des aufgenommenen radioaktiv markierten Thymidin, das in die DNA eingebaut wurde, ist abhängig von der DNA-Neusynthese und dient somit als Marker für die Proliferationsrate der Zellen.

Unreife DCs, reife unbeladene DCs und reife Antigen-beladene DCs wurden jeweils in Triplikaten in 5 verschiedenen Verdünnungsverhältnissen (500.000 Zellen/ml, 250.000 Zellen/ml, 125.000 Zellen/ml usw.) in 96-well-Rundbodenplatten angesetzt. Die Verdünnung erfolgte in Vollmedium mit 500 ng/ml CD40-L. Durch Zugabe einer gleich bleibenden Zahl autologer T-Zellen ( $1 \times 10^6$ ) zu den unterschiedlich verdünnten DCs konnten Kokulturen mit verschiedenen DC-T-Zell-Verhältnissen (1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320) angesetzt werden. Am Tag 5 der Kokultur wurden die Zellen mit [<sup>3</sup>H]-Thymidin (1mCi/well) gepulst. Nach 18 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit Hilfe eines *MicroCell Harvesters* auf eine Filtermatte geerntet und das nicht inkorporierte radioaktive Thymidin abgewaschen. Nach Trocknen der Filtermatte in einem Wärmeschrank und Überführen in Szintillationsflüssigkeit wurde die Menge an

eingebautem [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin in einem Szintillationszähler als Szintillationsereignis/min (cpm, *counts per minute*) bestimmt. Als Kontrolle diente die Messung der Proliferation in reinen T-Zell-Kulturen (ohne DCs).

#### 2.3.4.4 Standardisierte gemischte Lymphozytenreaktion (MLR)

Um den Einfluss von IL-4 auf die Entwicklung T-Zell-stimulierender Eigenschaften von DCs zu untersuchen, wurde in einer Standard *mixed lymphocyte reaction* (MLR) die proliferative T-Zell-Antwort allogener T-Zellen auf die Stimulation mit DCs getestet (Banchereau et al., 1998). Die Messung der proliferativen T-Zell-Antwort erfolgte hierbei ebenso wie oben beschrieben mit [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin. Monozyten wurden für 48 h mit GM-CSF und IL-4 oder mit proinflammatorischen Mediatoren und GM-CSF (ohne IL-4) oder mit proinflammatorischen Mediatoren, GM-CSF und IL-4 inkubiert. Alle drei DC-Typen wurden jeweils in Triplikaten in 5 verschiedenen Verdünnungsverhältnissen in 96-well-Rundbodenplatten angesetzt. Die Verdünnung erfolgte in Vollmedium. Durch Zugabe einer gleich bleibenden Zahl allogener T-Zellen ( $1 \times 10^6$ ) zu den unterschiedlich verdünnten DCs konnten Kokulturen mit verschiedenen DC/T-Zell-Verhältnissen angesetzt werden (siehe 2.3.4.3.). An Tag 5 der Kokultur wurden die Zellen mit [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin (1mCi/well) gepulst und nach 18 h Inkubation im Brutschrank wurde die Menge an eingebautem [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin in einem Szintillationszähler als Szintillationsereignis/min (cpm) bestimmt.

#### 2.3.5 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind als arithmetisches Mittel + SEM (*Standard error of mean* = Standardfehler des Mittels) angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mittels des zweiseitigen Student-t-Tests für paarige Stichproben parametrischer Verteilungen ermittelt. Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten  $< 0,05$  bzw.  $p < 0,01$  bzw.  $p < 0,001$  angenommen und ist durch Markierung mit einem \* bzw. \*\* bzw. \*\*\* angezeigt. Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm StatView D-4.5 (Abacus Concepts, CA, USA) durchgeführt. Die rechnerische Auswertung und

graphische Darstellung der Daten erfolgte mittels der Programme Microsoft Excel und Microsoft PowerPoint (Microsoft Cooperation, CA, USA).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Entwicklung einer neuen Methode zur beschleunigten Generierung dendritischer Zellen aus Monozyten *in vitro*: **FastDC**

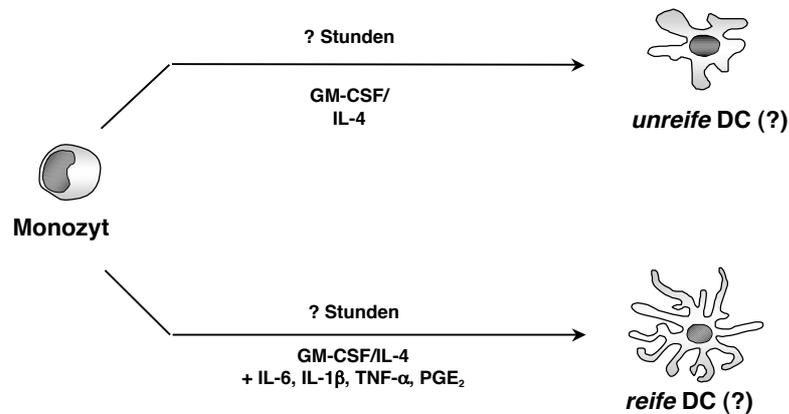
##### 3.1.1 Generierung reifer dendritischer Zellen aus Monozyten innerhalb von 48 Stunden

Die Generierung reifer DCs aus Monozyten *in vitro* wird allgemein nach einem von Sallusto und Lanzavecchia bzw. Romani et al. 1994 erstmals beschriebenen Protokoll durchgeführt: Die durch Dichtezentrifugation und Adhärenz aus PBMZ gewonnenen Monozyten werden für 5 bis 7 Tage mit GM-CSF und IL-4 kultiviert und anschließend für 24 bis 48 h mit unterschiedlichen Stimuli aktiviert (Romani et al., 1994; Sallusto et al., 1994). Es ist nicht bekannt, wie die Differenzierung von DCs aus Monozyten *in vivo* abläuft und ob die Vorgänge dem oben beschriebenen Standard-Protokoll ähnlich sind. Es mehren sich aber die experimentellen Hinweise darauf, dass die Differenzierung innerhalb einer kürzeren Zeitspanne ablaufen könnte.

Deshalb war es das Ziel der ersten Versuchsreihen, eine Methode zur beschleunigten Generierung von DCs aus Monozyten *in vitro* zu entwickeln. Dazu wurden Monozyten über Adhärenz oder mittels MACS aus PBMZ isoliert. Anschließend wurden die Monozyten in Vollmedium unter Zugabe von GM-CSF und IL-4 kultiviert. Zu einem Teil der Zellen wurde zusätzlich gleich zu Beginn der Kultur eine Kombination aus proinflammatorischen Mediatoren (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und PGE<sub>2</sub>) gegeben, um die Ausreifung von DCs zu induzieren (Abb. 3).

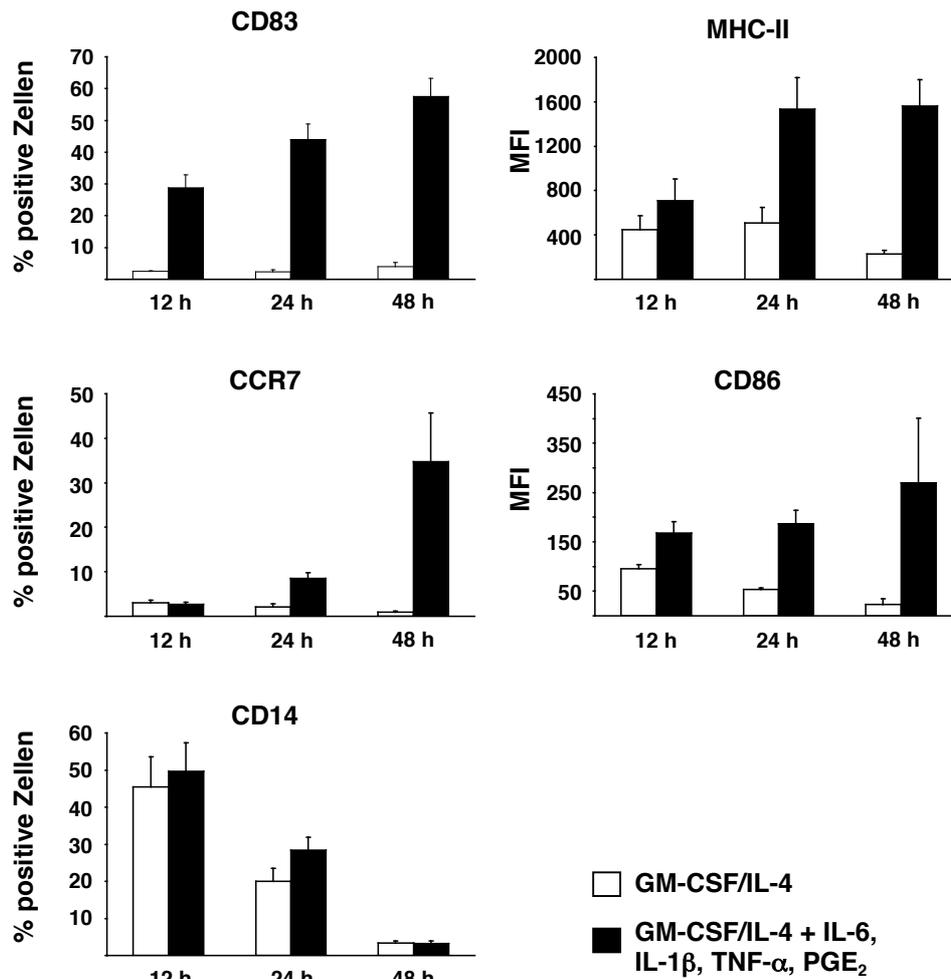
Zunächst sollte die minimale zur kompletten Ausreifung der DCs notwendige Kulturdauer bestimmt werden. Dazu wurden die Zellen, die von Beginn der Kultur mit GM-CSF, IL-4 und proinflammatorischen Mediatoren kultiviert wurden, nach verschiedenen Zeitpunkten (nach 12, 24, 48 und 72 h Gesamtkulturdauer) geerntet und mittels FACS-Analyse auf die Expression von Oberflächenmarkern untersucht. Die

Ergebnisse wurden mit der Expression von Oberflächenmarkern auf Monozyten verglichen, die für dieselbe Zeit nur mit GM-CSF und IL-4 kultiviert worden waren.



**Abbildung 3: Versuchsansatz zur beschleunigten Generierung von DCs aus Monozyten *in vitro*.** Monozyten wurden mit GM-CSF und IL-4 inkubiert, um unreife DCs zu gewinnen. Ein Teil der Monozyten wurde gleich zu Beginn der Kultur zusätzlich mit proinflammatorischen Mediatoren (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und PGE<sub>2</sub>) stimuliert, um die Ausreifung von DCs zu induzieren. Um herauszufinden, welche Kulturdauer mindestens zur kompletten Ausreifung der DCs notwendig ist, wurden beide Zellpopulationen zu verschiedenen Zeitpunkten (12, 24, 48 oder 72 h) der Kultur geerntet und der Phänotyp untersucht.

Mit proinflammatorischen Mediatoren stimulierte Zellen zeigten während der ersten 48 h Kultur kontinuierliche Zunahme der Expression typischer DC-Aktivierungsmarker (CD83, CCR7, MHC-II und CD86) und Abnahme der Expression des Monozytenmarkers CD14 (Abb. 4). Unstimulierte Zellen, die nur mit GM-CSF und IL-4 kultiviert worden waren, verloren ebenfalls den Monozytenmarker CD14. Im Gegensatz zu den stimulierten Zellen exprimierten sie aber nur in geringem Maße das kostimulierende Molekül CD86 und das Antigen-präsentierende Molekül MHC-II und blieben negativ für den Aktivierungsmarker CD83 und den Chemokinrezeptor CCR7. Damit zeigten sie nach nur 48 h Kultur den für unreife DCs typischen Immunphänotyp (Abb. 4). Nach insgesamt 72 h Kultur in Gegenwart von GM-CSF und IL-4 bzw. GM-CSF, IL-4 und proinflammatorischen Mediatoren konnten bei keinem der beiden Zelltypen weitere Änderungen in der Expression der Oberflächenmarker beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass die Differenzierung der DCs bereits nach 48 h Kultur abgeschlossen ist (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 4: Monozyten, die zu Beginn der Kultur mit GM-CSF, IL-4 und proinflammatorischen Mediatoren inkubiert wurden, exprimieren nach 48 h typische DC-Reife-Marker und sind CD14<sup>-</sup>.** Monozyten wurden entweder nur mit GM-CSF und IL-4 oder unter Zugabe von proinflammatorischen Mediatoren kultiviert. Nach 12, 24 und 48 h wurden die Zellen geerntet und die Expression verschiedener Oberflächenmarker wurde mittels FACS-Analyse untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Versuchsreihen mit verschiedenen Spendern sowie die Standardabweichungen der Mittelwerte (SEM).

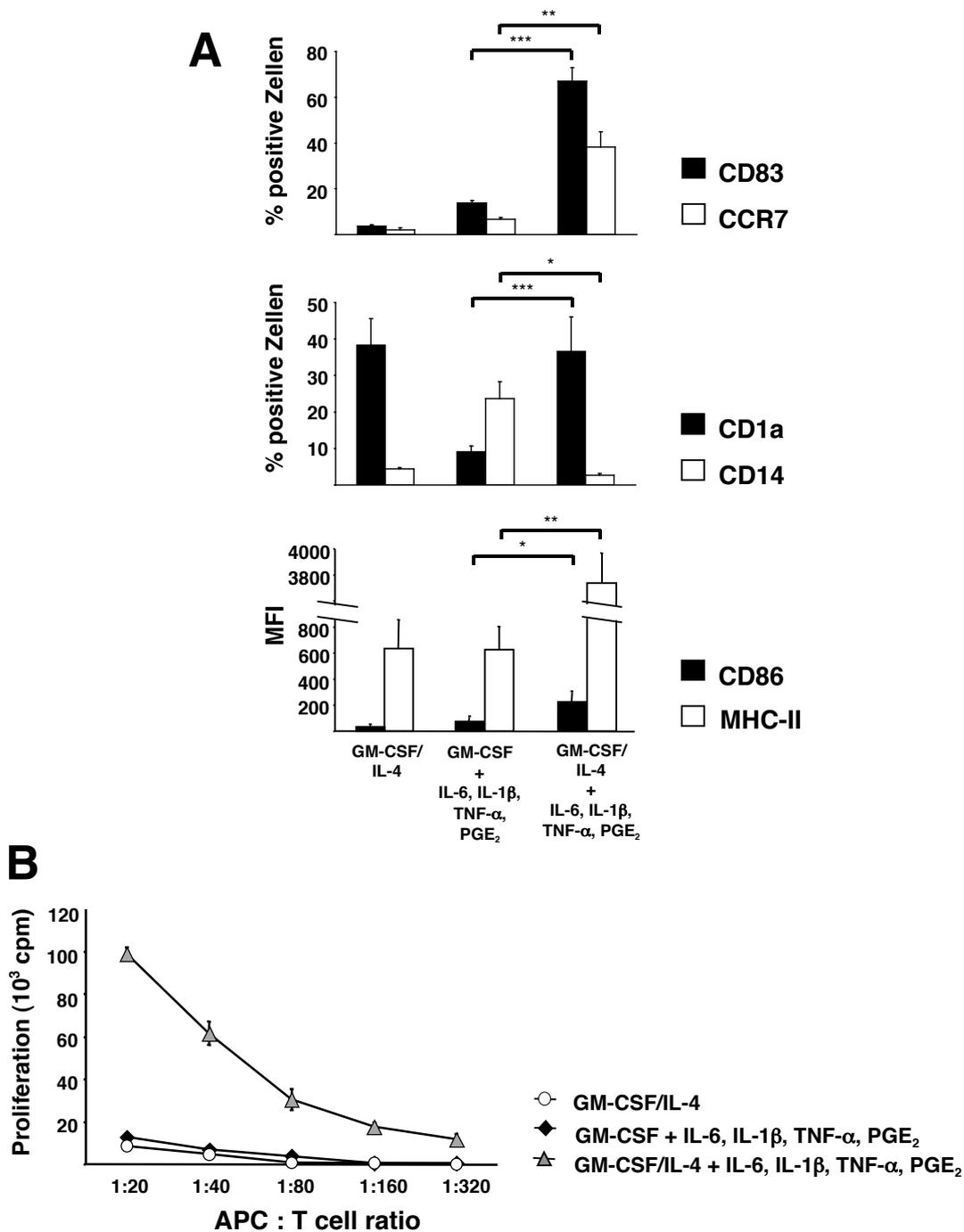
### 3.1.2 Einfluss von Interleukin-4 auf den Phänotyp dendritischer Zellen

Im nächsten Versuchsansatz sollte der Einfluss von IL-4 auf die Differenzierung von Monozyten in Gegenwart von verschiedenen Mediatoren untersucht werden. Hierzu wurden Monozyten entweder mit GM-CSF und IL-4 oder mit GM-CSF, IL-4 und proinflammatorischen Mediatoren oder nur mit GM-CSF und der Kombination aus proinflammatorischen Mediatoren (ohne IL-4) für 48 h kultiviert und anschließend

sowohl phänotypisch als auch funktionell miteinander verglichen. Es ist bekannt, dass Monozyten in Gegenwart von GM-CSF zu Makrophagen differenzieren (Santin et al., 1999). Durch die gleichzeitige Zugabe von IL-4 in die Zellkultur kann die Entwicklung von Monozyten zu Makrophagen unterdrückt werden. IL-4 ist hierbei für den Verlust des Monozyten- und Makrophagenmarkers CD14 verantwortlich (Peters et al., 1991; Ruppert et al., 1993).

Nach 48 h Kultur wurden die verschiedenen Zelltypen zunächst lichtmikroskopisch miteinander verglichen. Morphologisch ähnelten Zellen, die nur mit GM-CSF und IL-4 kultiviert worden waren, den ursprünglich eingesetzten Monozyten: sie waren rund und zum Teil adhären. Zellen, die in Gegenwart von IL-4 mit den proinflammatorischen Mediatoren stimuliert worden waren, zeigten morphologische Kennzeichen reifer DCs (Banchereau et al., 1998): sie schwammen weitgehend lose im Medium der Kulturschale, bildeten kleine Zellaggregate und entwickelten feine Zytoplasma-Ausläufer. Im Gegensatz dazu zeichneten sich Monozyten, die ohne Anwesenheit von IL-4 mit proinflammatorischen Mediatoren stimuliert worden waren, durch starke Adhärenz aus und waren wie Makrophagen flach und spindelförmig ohne Ausläufer (Daten nicht gezeigt).

In der Analyse der Expression der Oberflächenmarker im FACS-Gerät zeigten Monozyten, die mit GM-CSF und IL-4 inkubiert wurden, nach 48 h alle Charakteristika unreifer DCs ( $CD14^-$ ,  $CD83^-$ ,  $CCR7^-$ ,  $CD1a^+$ ,  $CD86^{low}$  und  $MHC-II^{low}$ ) (Abb. 5A). Durch Stimulation der Zellen mit proinflammatorischen Mediatoren in Gegenwart von IL-4 kam es wie bereits beschrieben zur Zunahme von DC-Aktivierungsmarkern ( $CD83$ ,  $CCR7$ ,  $MHC-II$  und  $CD86$ ) und zur Abnahme des Monozytenmarkers  $CD14$ . Ebenso exprimierten die Zellen das Antigen-präsentierende Molekül  $CD1a$ , das typischerweise auf der Oberfläche unreifer und reifer DCs gefunden wird (Abb. 5A). Wurden Monozyten jedoch nur in Anwesenheit von GM-CSF (ohne IL-4) mit der Kombination aus proinflammatorischen Mediatoren stimuliert, so entwickelten sich Zellen mit Makrophagen-ähnlichem Phänotyp. Die Zellen exprimierten nur in geringem Maße die DC-Aktivierungsmarker  $CD83$ ,  $CCR7$ ,  $CD86$ ,  $MHC-II$  und  $CD1a$ . Dagegen exprimierten ca. 30 % der Zellen den Monozyten- und Makrophagenmarker  $CD14$ , so dass angenommen werden kann, dass sich nach 48 h bereits eine Makrophagen-Subpopulation in der Kultur gebildet hatte (Abb. 5A).



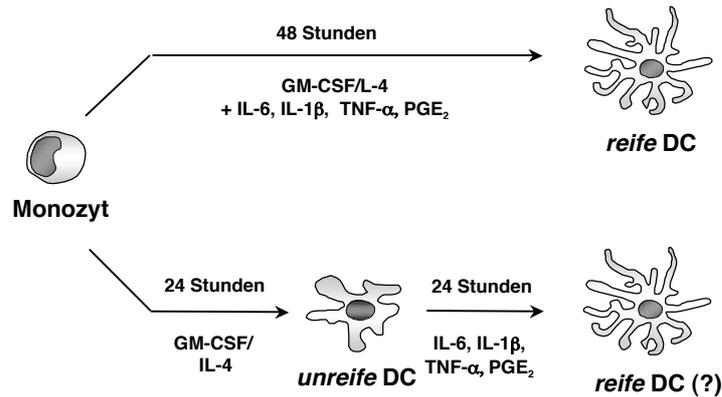
**Abbildung 5: IL-4 ist unverzichtbar für die Differenzierung von DCs.** Monozyten wurden entweder mit GM-CSF und IL-4 oder mit GM-CSF, IL-4 und proinflammatorischen Mediatoren oder nur mit GM-CSF und der Kombination aus proinflammatorischen Mediatoren (ohne IL-4) kultiviert. Nach 48 h Kultur wurden die verschiedenen Zelltypen geerntet und mittels FACS-Analyse auf die Expression der Oberflächenmarker untersucht (A; dargestellt sind die Mittelwerte aus 6 Versuchsreihen mit verschiedenen Spendern sowie die Standardabweichungen der Mittelwerte (SEM)). In einem zweiten Schritt wurden die verschiedenen DC-Typen mit allogenen T-Zellen kokultiviert (siehe Material und Methoden 2.3.4.4.) Um die T-Zell-Proliferation zu bestimmen, wurden die Zellen am Tag 5 der Kokultur mit [<sup>3</sup>H]-Thymidin gepulst. Nach 18 h wurde die [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Aufnahme gemessen (dargestellt als Szintillationsereignisse/min (cpm)) (B; die Proliferationsergebnisse zeigen einen repräsentativen Versuch aus 4 Versuchsreihen mit verschiedenen Spendern).

Erhebliche Unterschiede konnten auch funktionell zwischen den verschiedenen Zelltypen festgestellt werden. Es wurde die Fähigkeit der Zellen zur IL-12-Sekretion mittels ELISA in den Kulturüberständen und ihre Fähigkeit zur Stimulation allogener T-Zellen in einer Standard-MLR untersucht. Während unstimulierte Zellen kein IL-12 sezernierten, führte bei den mit proinflammatorischen Mediatoren stimulierten Zellen die Zugabe von IL-4 in die Kultur zu einer etwa 30-fachen Erhöhung der Zytokinsekretion (Daten nicht gezeigt). In Übereinstimmung dazu konnten folglich weder unstimulierte Zellen noch in Abwesenheit von IL-4 mit proinflammatorischen Mediatoren stimulierte Zellen eine Proliferation allogener T-Zellen induzieren. Im Gegensatz dazu führten Zellen, die in Gegenwart von IL-4 stimuliert worden waren, zu einer starken Aktivierung und proliferativen Antwort allogener T-Zellen (Abb. 5B).

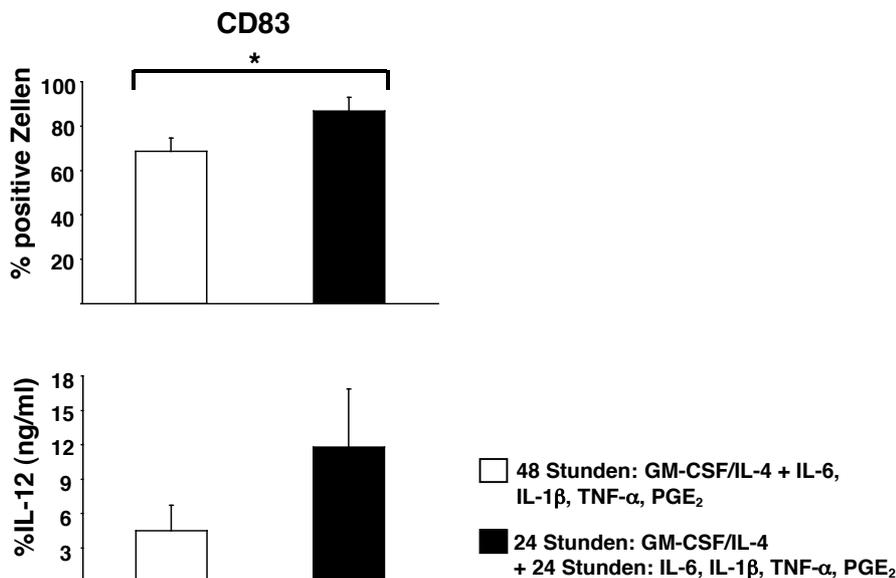
### 3.1.3 Vergleich zweier Methoden zur beschleunigten Generierung dendritischer Zellen *in vitro*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass phänotypisch reife DCs innerhalb von 48 h aus Monozyten generiert werden können, sollte in einem nächsten Schritt die optimale Methode zur beschleunigten Generierung von DCs identifiziert werden. Neben dem bereits beschriebenen Versuchsansatz, bei dem Stimulationsfaktoren gleich von Anfang an in die Monozyten-Kultur gegeben wurden, wurde in einem weiteren Versuchsansatz ein zweistufiges Modell getestet, bei dem die Zugabe der Stimulationsfaktoren in die Zellkultur erst nach 24 h Kultur mit GM-CSF und IL-4 erfolgte. In beiden Fällen wurden die Zellen nach insgesamt 48 h Kultur geerntet (Abb. 6).

Die Expression des wichtigsten DC-Reifemarkers CD83 und die Fähigkeit zur IL-12-Sekretion beider Zelltypen wurden miteinander verglichen. Zellen, die nach dem zweistufigen Protokoll, d.h. 24 h Kultur mit GM-CSF und IL-4 gefolgt von 24 h Stimulation, generiert wurden, zeigten eine signifikant höhere Expression des Oberflächenmarkers CD83 (Abb. 7, oben) und dreifach erhöhte Sekretion des Zytokins IL-12 (Abb. 7, unten) im Vergleich zu Zellen, die gleich zu Beginn der Kultur mit



**Abbildung 6: Vergleich zweier alternativer Methoden zur Generierung von DCs aus Monozyten innerhalb von 48 h.** Monozyten wurden mit GM-CSF und IL-4 inkubiert. Zur Beschleunigung der Ausreifung der DCs wurden die Monozyten entweder zu Beginn der Kultur (oben) oder nach 24 h Kultur (unten) mit GM-CSF und IL-4 zusätzlich mit proinflammatorischen Mediatoren (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und PGE<sub>2</sub>) stimuliert. Beide Zellpopulationen wurden nach insgesamt 48 h Kultur geerntet, um Phänotyp und Funktion zu untersuchen.



**Abbildung 7: DCs, die nach dem zweistufigen Stimulations-Protokoll generiert werden, zeigen eine deutlich höhere Expression des Oberflächenmarkers CD83 und sezernieren mehr IL-12.** Monozyten wurden entweder zu Beginn der Kultur oder nach 24 h Kultur mit GM-CSF und IL-4 zusätzlich mit IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und PGE<sub>2</sub> stimuliert. Nach insgesamt 48 h Kultur wurden die Zellen geerntet. Die Expression des DC-Reifemarkers CD83 wurde mittels FACS-Analyse (oben) bestimmt. Gesamt-IL-12 (IL-12p40 und IL-12p70) wurde in den Kulturüberständen gemessen (unten). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 Versuchsreihen mit verschiedenen Spendern.

GM-CSF und IL-4 zusätzlich stimuliert worden waren. Obwohl bei jedem einzelnen Spender in etwa eine Verdreifachung der IL-12-Sekretion beobachtet wurde, konnte aufgrund der großen Schwankungen der maximalen IL-12-Werte innerhalb der verschiedenen Spender für diese Tendenz keine statistische Signifikanz festgestellt werden.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass reife DCs aus Monozyten innerhalb von 48 h generiert werden können. IL-4 ist dabei unverzichtbar für die Differenzierung von DCs. Die zweistufige Differenzierungs- und Aktivierungsstrategie erwies sich als überlegen gegenüber der Aktivierung der Monozyten bereits zu Beginn der Kultur. Zellen, die nach der zweistufigen Methode generiert wurden, werden im Folgenden als *FastDC* bezeichnet.

#### 3.1.4 Auswirkung verschiedener Monozyten-Isolationstechniken

Monozyten wurden aus PBMZ in den verschiedenen Versuchen entweder über Adhärenz oder mittels MACS-Technik mit CD14 *MicroBeads* isoliert. Um zu untersuchen, welche Auswirkungen die unterschiedlichen Isolationstechniken der Monozyten haben, wurden zunächst die Reinheit und Ausbeute der Monozyten nach Adhärenz bzw. MACS miteinander verglichen. Sowohl hinsichtlich der Ausbeute als auch hinsichtlich der Reinheit der Monozyten, war die MACS-Technik dem Adhärenzschritt überlegen. Nach Aufreinigung mit der MACS-Technik war die Ausbeute der Zellen durchgehend mindestens doppelt so hoch wie nach dem Adhärenzschritt. Aus 100 ml Spenderblut erhielt man nach magnetischer Zellseparation durchschnittlich  $20 \times 10^6$  Monozyten im Vergleich zu durchschnittlich  $7 \times 10^6$  Zellen nach Adhärenz im Brutschrank. Auch die Reinheit der Monozyten war mit stets über 95 % nach Anwendung der MACS-Technik wesentlich höher als nach dem Adhärenzschritt (durchschnittlich 72 %) (Tabelle 5).

Die Isolationstechnik der Monozyten hatte jedoch weder Einfluss auf den Phänotyp noch auf die Funktion der anschließend generierten DCs. In beiden Fällen betrug die Ausbeute bis zu 50 % der initial eingesetzten Monozyten (Daten nicht gezeigt).

Isolationstechnik	Spenderzahl	Mittelwert	Bereich (SEM)
Reinheit nach MACS	26	97 %	92 – 99 % (0,4)
Reinheit nach Adhärenzschrift	32	72 %	42 – 86 % (2,2)
Ausbeute (Monozyten) aus 100 ml Blut nach MACS	22	23 Mio.	8 – 42 Mio. (1,9)
Ausbeute (Monozyten) aus 100 ml Blut nach Adhärenzschrift	28	7 Mio.	3 – 22 Mio. (0,8)

**Tabelle 5: Vergleich von Reinheit und Ausbeute der Monozyten nach Isolation mittels MACS bzw. Adhärenzschrift:** verglichen werden der Mittelwert, der Bereich und die Standardabweichung (SEM) der Reinheit bzw. Ausbeute (angegeben in % bzw. Mio. Monozyten).

## 3.2 Phänotypische Charakterisierung von *FastDC*

### 3.2.1 Vergleich der Expression charakteristischer Oberflächenmarker auf *FastDC* und Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen

Nachdem sich das von Romani et al. 1994 eingeführte Protokoll in der Praxis bewährt hat und zuverlässig reife moDCs liefert (Romani et al., 1994), sollte als nächstes ein direkter Vergleich zwischen *FastDC* und den nach dem Standard-Protokoll generierten moDCs angestellt werden. Um moDCs zu generieren, wurden die Monozyten für 6 Tage mit GM-CSF und IL-4 kultiviert und für weitere 24 h mit proinflammatorischen Mediatoren stimuliert (Abb. 2, unten). Alternativ wurden Monozyten entweder für 48 h mit GM-CSF und IL-4 inkubiert, um unstimulierte Kontrollen zu erhalten, oder während der letzten 24 h Kultur mit proinflammatorischen Mediatoren stimuliert, um *FastDC* zu generieren (Abb. 6, unten).

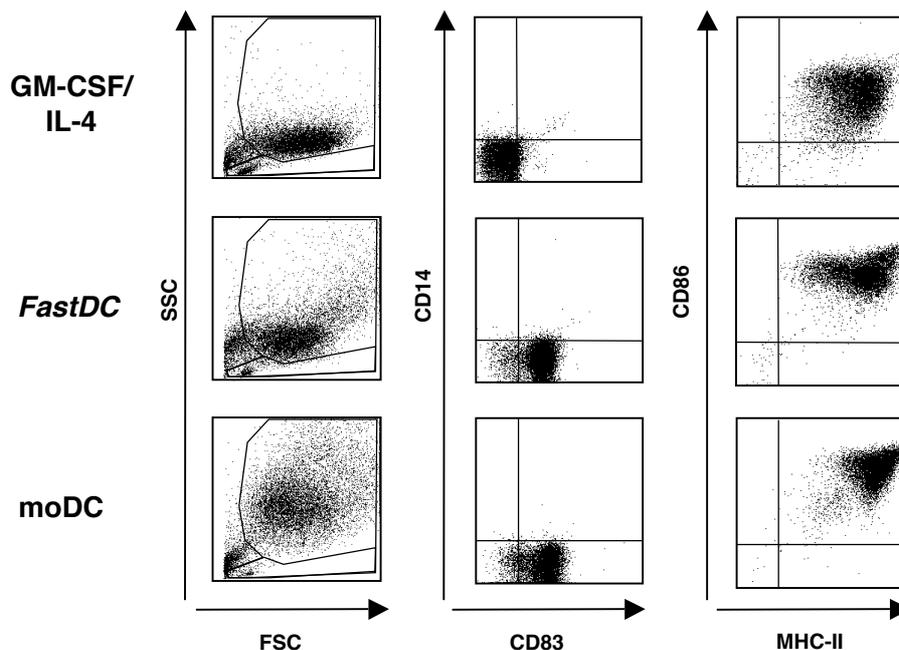
Zunächst wurde die Morphologie der verschiedenen Zelltypen im Lichtmikroskop miteinander verglichen. Zellen, die nur mit GM-CSF und IL-4 kultiviert worden waren, ähnelten morphologisch der initial eingesetzten Monozyten-Population. *FastDC* waren verglichen mit Monozyten etwa gleich groß, aber weniger adhären und entwickelten

zarte zytoplasmatische Ausläufer. Im Gegensatz dazu zeigten reife moDCs eine deutliche Größenzunahme und hatten lange, kräftige zytoplasmatische Ausläufer. Sowohl moDCs als auch *FastDC* bildeten multiple Zellaggregate in der Kulturschale (Daten nicht gezeigt).

Diese Beobachtungen konnten durch Betrachtung der Zellen im FSC/SSC des FACS-Gerätes bestätigt werden (Abb. 8, links). Verglichen mit Monozyten, die nur mit GM-CSF und IL-4 inkubiert wurden (Abb. 8, oben), hatten *FastDC* (Abb. 8, mitte) eine erhöhte Streuung im FSC/SSC und moDCs (Abb. 8, unten) die maximale Streuung, d.h. erheblich an Größe und Granularität zugenommen. Mittels FACS-Analyse wurde außerdem die Expression der Oberflächenmarker aller drei Zell-Typen miteinander verglichen. Wie bereits beschrieben, zeigten Monozyten, die mit GM-CSF und IL-4 inkubiert wurden, verminderte Expression des Monozytenmarkers CD14 und mäßige Expression der Moleküle CD86 und MHC-II (Abb. 8, oben). *FastDC* exprimierten den für voll ausgereifte DCs typischen Immunphänotyp (CD83<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD86<sup>high</sup>MHC-II<sup>high</sup>). Die Expression der Oberflächenmarker auf *FastDC* war vergleichbar mit der auf Standard-moDCs (Abb. 8, mitte und unten). Im Vergleich zum Standard-Protokoll (maximal 30 % der Ausgangspopulation) erbrachte die Generierung von *FastDC* zuverlässig eine höhere Ausbeute vitaler und reifer DCs (bis zu 50 % der Ausgangspopulation) (Tabelle 6).

DC-Ausbeute (aus 1 Mio.)	Spenderzahl	Mittelwert	Bereich
<i>FastDC</i>	30	300.000	150.000 – 725.000
moDC	29	130.000	67.000 – 341.000

**Tabelle 6: Vergleich der Ausbeute an *FastDC* bzw. moDCs aus 1 Million eingesetzten Monozyten nach 2 bzw. 7 Tagen Kultur:** verglichen werden der Mittelwert und der Bereich, in dem die Ausbeute nach Anwendung der verschiedenen Protokolle lag (angegeben ist die mit der Neubauer-Zählkammer ermittelte Zellzahl).



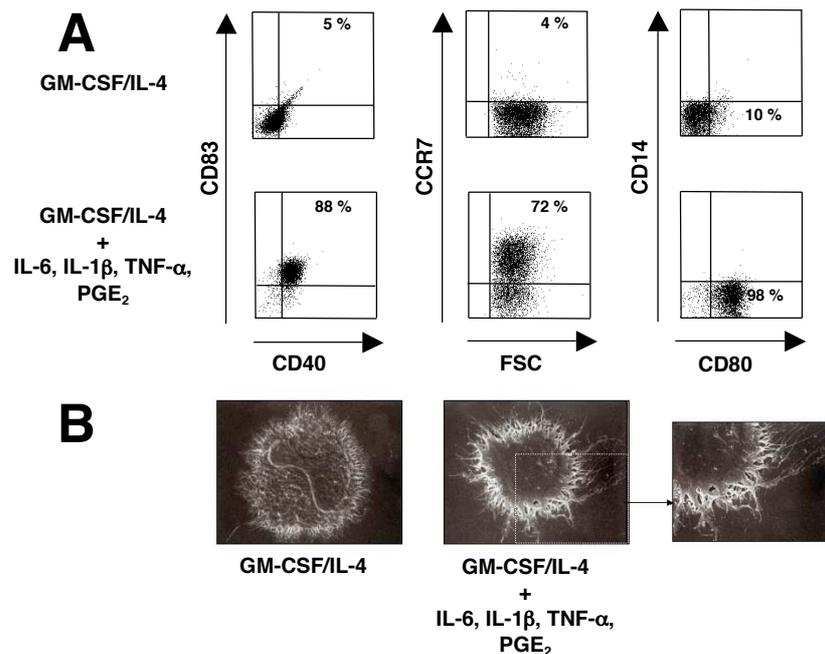
**Abbildung 8: Die Expression von DC-Aktivierungs-Markern auf *FastDC* ist vergleichbar mit ihrer Expression auf Standard-moDCs.** Monozyten wurden entweder für 48 h nur mit GM-CSF und IL-4 inkubiert (oben) oder für die letzten 24 h der Kultur mit IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und PGE<sub>2</sub> stimuliert (mitte). Die Lage im FSC/SSC und die Expression der Oberflächenmarker wurden mit Standard-moDCs verglichen. Dargestellt sind die Ergebnisse einer repräsentativen FACS-Analyse aus 4 unabhängigen Versuchsreihen.

### 3.2.2 Morphologische und durchflusszytometrische Charakterisierung von *FastDC*

Zur genaueren Charakterisierung der *FastDC* wurde die Expression weiterer Oberflächenmarker mittels FACS-Analyse betrachtet: die kostimulierenden Moleküle CD80 und CD40 und der Chemokinrezeptor CCR7 (Abb. 9A). Monozyten wurden für 48 h nur mit GM-CSF und IL-4 inkubiert oder für die letzten 24 h Kultur mit proinflammatorischen Mediatoren aktiviert. Die unstimulierten Zellen zeigten mäßige Expression von CD80 und CD40 und waren CD83<sup>-</sup> und CCR7<sup>-</sup> (Abb. 9A, oben). Stimulierte *FastDC* dagegen zeigten homogene Expression aller vier DC-Aktivierungs-Marker: CD83, CCR7, CD80 und CD40 (Abb. 9A, unten). Der Monozytenmarker CD14 wurde auf keinem der beiden Zelltypen exprimiert.

Zusätzlich wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *FastDC* gemacht. Diese Aufnahmen bestätigten die Beobachtungen, die im Lichtmikroskop gemacht

wurden: Monozyten, die für 48 h nur mit GM-CSF und IL-4 inkubiert worden waren, ähnelten morphologisch der Ausgangspopulation von Monozyten: sie waren rund und hatten wenige kurze zytoplasmatische Ausläufer (Abb. 9B, links). *FastDC* hatten im Vergleich dazu zwar nicht an Größe zugenommen, bildeten aber lange zarte Zytoplasma-Ausläufer, die ein charakteristisches Zeichen reifer DCs darstellen (Banchereau et al., 1998) (Abb. 9B, mitte und Vergrößerung rechts).



**Abbildung 9: Monozyten, die mit GM-CSF, IL-4 und proinflammatorischen Mediatoren inkubiert werden, entwickeln sich innerhalb von 48 h in reife DCs (*FastDC*). Monozyten wurden für 48 h entweder nur mit GM-CSF und IL-4 inkubiert oder sie wurden für die letzten 24 h Kultur zusätzlich mit IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und PGE<sub>2</sub> stimuliert. Die Expression der DC-Reifemarker und von CD 14 wurde mittels FACS-Analyse (A) bestimmt. Gezeigt sind die Ergebnisse einer repräsentativen FACS-Analyse aus 5 unabhängigen Versuchsreihen. Morphologisch wurden die Zellen im Rasterelektronenmikroskop (B) dargestellt.**

### 3.3 Einfluss verschiedener proinflammatorischer Mediatoren und Zytokine auf die Reifung von *FastDC*

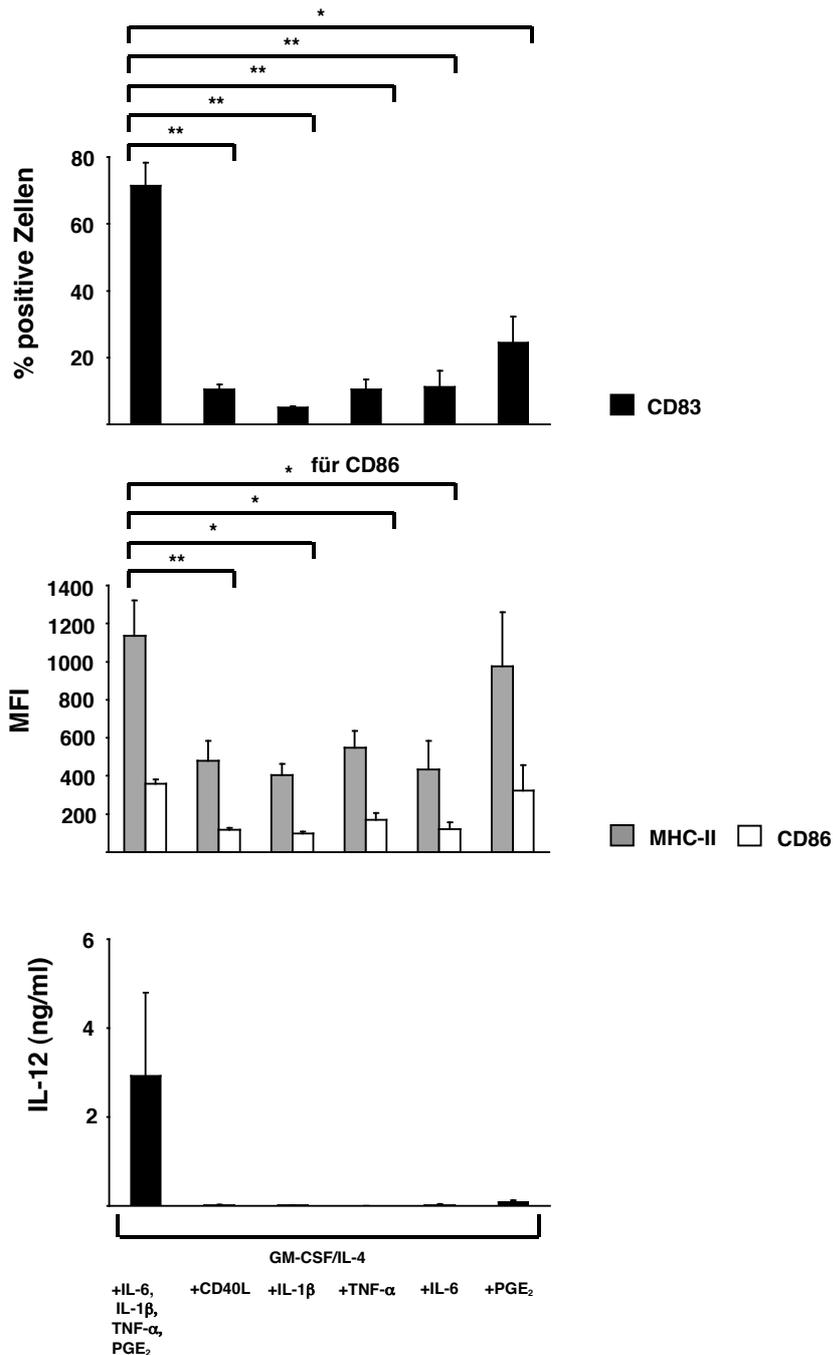
Nach der Etablierung eines Protokolls zur Generierung reifer DCs aus Monozyten innerhalb von 48 h wurde als nächstes der Einfluss der benutzten

proinflammatorischen Mediatoren und weiterer stimulierender Zytokine untersucht. Insbesondere sollten die Mediatoren, die für die Ausreifung von *FastDC* unverzichtbar sind, identifiziert werden. Der zur Stimulation von *FastDC* verwendete Cocktail aus den vier proinflammatorischen Mediatoren TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und PGE<sub>2</sub> wurde erstmals von Jonuleit et al. als effektivste Stimulationsmethode beschrieben (Jonuleit et al., 1997). Nachfolgend wurde dies von verschiedenen Arbeitsgruppen bestätigt.

### 3.3.1 Wirkung einzelner proinflammatorischer Mediatoren auf *FastDC*

In einem ersten Schritt sollte der Einfluss der einzelnen im benutzten Stimulationscocktail enthaltenen proinflammatorischen Mediatoren (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und PGE<sub>2</sub>) untersucht und mit der Stimulation mit löslichem CD40-L Trimer, einem T-Zell-abhängigen Reifestimulus von DCs, verglichen werden. Dazu wurden Monozyten für 24 h mit GM-CSF und IL-4 kultiviert und für die folgenden 24 h mit der Kombination aus allen vier proinflammatorischen Mediatoren, mit jedem einzelnen Mediator alleine oder mit löslichem CD40-L stimuliert. Nach insgesamt 48 h Kultur wurde bei den unterschiedlich aktivierten Zellen die Expression der Oberflächenmarker mittels FACS-Analyse und die IL-12-Sekretion mittels ELISA untersucht.

Dabei zeigte sich, dass keiner der Mediatoren oder lösliches CD40-L Trimer alleine in der Lage war, die Ausreifung der *FastDC* ausreichend zu induzieren: die Zellen exprimierten kaum CD83, trugen mit Ausnahme der mit PGE<sub>2</sub> stimulierten Zellen nur in geringem Maße CD86 und MHC-II auf ihrer Oberfläche und sezernierten kein IL-12 (Abb. 10). PGE<sub>2</sub> erwies sich als der potenteste aller Stimuli: die Aktivierung mit PGE<sub>2</sub> bewirkte die Bildung einer kleinen Subpopulation CD83 positiver Zellen (ca. 25 %); außerdem war die durch PGE<sub>2</sub> induzierte Expression von MHC-II und CD86 vergleichbar mit der durch die Kombination aller proinflammatorischen Mediatoren induzierten Expression dieser Marker (Abb. 10).



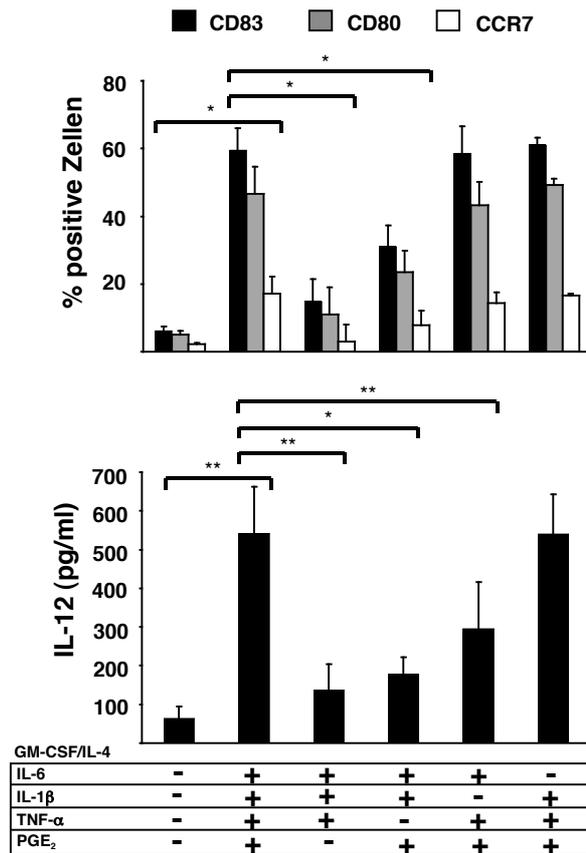
**Abbildung 10: Nur eine Kombination proinflammatorischer Mediatoren führt zur vollen Ausreifung von *FastDC*.** Monozyten wurden für 24 h mit GM-CSF und IL-4 inkubiert und für weitere 24 h zusätzlich stimuliert. Die Stimulation mit der Kombination aus allen vier proinflammatorischen Mediatoren wurde mit der Stimulation mit jedem einzelnen Mediator alleine bzw. mit löslichem CD40-L Trimer verglichen. Nach insgesamt 48 h Kultur wurde die Expression der Oberflächenmarker mittels FACS-Analyse bestimmt (oben und mitte), Gesamt-IL-12 (IL-12p40 und IL-12p70) wurde in den Kulturüberständen mittels ELISA gemessen (unten). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 4 Versuchsreihen mit verschiedenen Spendern.

### 3.3.2 Identifikation der zur vollen Ausreifung der *FastDC* notwendigen proinflammatorischen Mediatoren

Nachdem gezeigt werden konnte, dass keiner der vier proinflammatorischen Mediatoren alleine in der Lage ist, die volle Ausreifung von *FastDC* zu induzieren, sollte als nächstes untersucht werden, ob einzelne der vier Mediatoren für die Ausreifung der *FastDC* verzichtbar sind. Monozyten wurden hierzu entweder für 48 h nur mit GM-CSF und IL-4 kultiviert oder während der letzten 24 h Kultur mit verschiedenen Kombinationen der vier proinflammatorischen Mediatoren TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und PGE<sub>2</sub> stimuliert. Nach insgesamt 48 h Kultur wurden die verschiedenen stimulierten Zellen sowohl auf die Expression der Oberflächenmarker als auch auf ihre Fähigkeit zur IL-12-Sekretion geprüft und mit maximal stimulierten Zellen, die mit allen vier Mediatoren aktiviert worden waren, verglichen.

Nur Kombinationen, die PGE<sub>2</sub> und TNF- $\alpha$  enthielten, führten zur vollen phänotypischen Ausreifung der *FastDC*, die mit über 50 % CD83 positiven Zellen definiert wurde. In der Expression der Reifemarker bei Stimulation mit PGE<sub>2</sub> und TNF- $\alpha$  (exemplarisch dargestellt sind CD83, CD80 und CCR7) konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zu maximal stimulierten Zellen festgestellt werden (Abb. 11, oben). Wurde dagegen PGE<sub>2</sub> aus der Kombination der vier Mediatoren weggelassen, so führte dies beinahe zum fast vollständigen Ausbleiben des Ausreifungsprozesses der *FastDC*. Auch das Herausnehmen von TNF- $\alpha$  aus der Kombination führte zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Expression der Oberflächenmarker (Abb. 11, oben).

Es zeigte sich, dass PGE<sub>2</sub> und TNF- $\alpha$  nicht nur eine Rolle in der Induktion der Reifemarker spielten, sondern auch bei der Induktion der IL-12-Produktion synergistisch zusammen wirkten. Die durch PGE<sub>2</sub> und TNF- $\alpha$  induzierte IL-12-Produktion konnte jedoch durch Zugabe von IL-1 $\beta$  signifikant gesteigert werden. Ebenso zeigte IL-1 $\beta$  bei der IL-12-Induktion synergistische Wirkung mit PGE<sub>2</sub> alleine. Dagegen erwies sich IL-6 als entbehrlich für die Stimulation von *FastDC* (Abb. 11, unten).



**Abbildung 11: Eine Kombination aus mindestens drei proinflammatorischen Mediatoren, PGE<sub>2</sub>, TNF-α und IL-1β, ist für die volle Ausreifung von *FastDC* notwendig.** Monozyten wurden für 48 h entweder nur mit GM-CSF und IL-4 inkubiert oder sie wurden für die letzten 24 h Kultur zusätzlich stimuliert. Die Stimulation erfolgte mit unterschiedlichen Kombinationen aus den proinflammatorischen Mediatoren IL-6, IL-1β, TNF-α und PGE<sub>2</sub>. Die Expression der Oberflächenmarker wurde mittels FACS-Analyse bestimmt (oben), Gesamt-IL-12 wurde in den Kulturüberständen mittels ELISA gemessen (unten). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus 6 Versuchsreihen mit verschiedenen Spendern.

### 3.3.3 Modell der sequentiellen Stimulation der *FastDC*

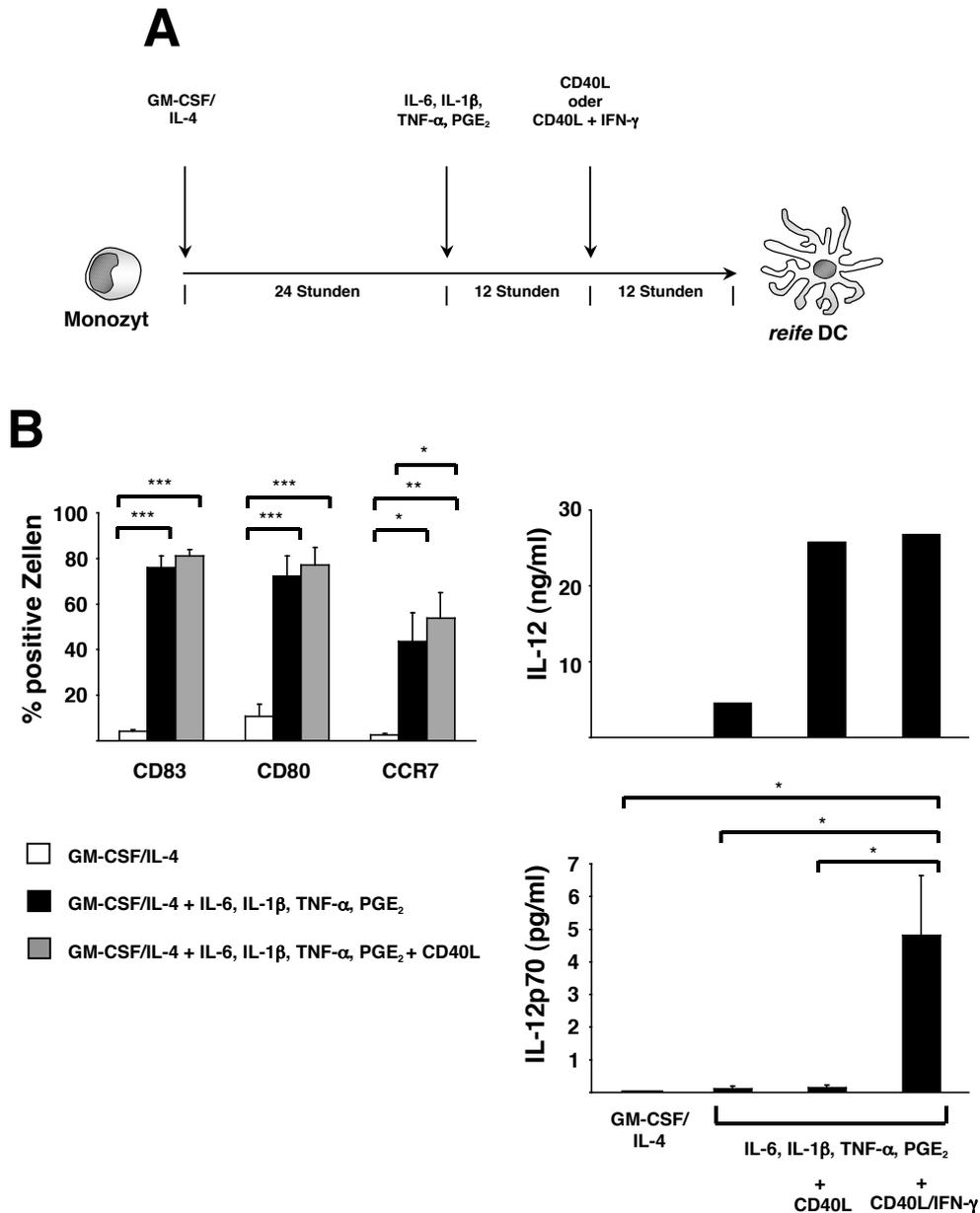
*In vivo* führt die Stimulation von DCs mit infektiösen Organismen, proinflammatorischen Mediatoren oder CD40-L zur IL-12-Produktion der DCs (Trinchieri, 1998). Von IL-12 gibt es zwei Unterformen: das inaktive IL-12p40 Homodimer und das bioaktive IL-12p70 Heterodimer, das sich aus den beiden Untereinheiten p40 und p35 zusammensetzt (Hochrein et al., 2000). IL-12p70 ist ein entscheidender Faktor bei der Induktion IFN-γ-produzierender aktivierter T-Lymphozyten. Viele Stimuli, die zwar zur

phänotypischen Ausreifung von DCs führen, reichen nicht aus, die Produktion des bioaktiven IL-12p70 in moDCs zu induzieren (Cella et al., 1996).

Um die Fähigkeit der *FastDC* zur Sekretion des bioaktiven IL-12p70 zu testen, wurden die Kulturüberstände von Monozyten, die entweder für 48 h nur mit GM-CSF und IL-4 kultiviert oder für die letzten 24 h Kultur zusätzlich mit proinflammatorischen Mediatoren stimuliert worden waren, geerntet und auf Gesamt-IL-12 und IL-12p70 untersucht. Während Monozyten, die nur mit GM-CSF und IL-4 inkubiert wurden, kein IL-12 sezernierten, produzierten *FastDC* geringe Mengen Gesamt-IL-12. *FastDC* konnten jedoch kein IL-12p70 sezernieren (Abb. 12B, rechts).

Deshalb wurden *FastDC* nach 12 h Stimulation mit den proinflammatorischen Mediatoren für weitere 12 h zusätzlich mit löslichem CD40-L stimuliert (sequentielle Stimulation) (Abb. 12A). CD40-L ist ein Stimulus, der bei moDCs zur Induktion des bioaktiven IL-12p70 führt (Luft et al., 2002a). Die Zugabe von CD40-L zur Kultur der *FastDC* sollte die Interaktion zwischen CD40-L-exprimierenden aktivierten T-Lymphozyten mit CD40-exprimierenden reifen DCs nach ihrer Wanderung in die sekundären lymphatischen Organe simulieren. Da aber bekannt ist, dass CD40-L zur Induktion maximaler Sekretion von bioaktivem IL-12p70 zusätzliche Signale aktivierter T-Zellen, wie z.B. IFN- $\gamma$ , benötigt, wurde in einem zweiten Schritt die sequentielle Stimulation sowohl mit DC40-L als auch mit IFN- $\gamma$  durchgeführt (Kalinski et al., 2000; Snijders et al., 1998). Nach insgesamt 48 h Kultur wurden die Zellen und ihre Kulturüberstände geerntet.

Die sequentielle Stimulation mit DC40-L bewirkte zwar eine Erhöhung der Gesamt-IL-12-Sekretion bei *FastDC*, hatte aber keinen Einfluss auf die Sekretion des bioaktiven IL-12p70 (Abb. 12B, rechts). Erfolgte die Bindung von CD40-L an seine Rezeptoren jedoch in Gegenwart von IFN- $\gamma$ , so wurde die Sekretion von bioaktiven IL-12p70 durch *FastDC* signifikant gesteigert (Abb. 12B, rechts). Obwohl eine etwa 3-fache Erhöhung der Sekretion von Gesamt-IL-12 durch sequentiell stimulierte Zellen in jedem einzelnen Experiment (n=6) beobachtet wurde, erreichte diese Tendenz aufgrund der großen Schwankungen der maximalen IL-12-Werte innerhalb der verschiedenen Spender keine statistische Signifikanz.



**Abbildung 12: Das Modell der sequentiellen Stimulation: CD40-L hat kaum Einfluss auf die Expression von Oberflächenmarkern, erhöht aber die IL-12-Produktion von *FastDC*; zur Induktion von IL-12p70 wird zusätzlich IFN- $\gamma$  benötigt.** Monozyten wurden für 48 h entweder nur mit GM-CSF und IL-4 inkubiert oder sie wurden für die letzten 24 h Kultur zusätzlich mit IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und PGE $_2$  stimuliert. Wo angegeben, wurde 12 h nach der Stimulation CD40-L oder CD40-L und IFN- $\gamma$  in die Kultur gegeben (Protokoll: A). Nach 48 h wurden die Zellen und Kulturüberstände geerntet. Die Expression der Oberflächenmarker wurde mittels FACS-Analyse bestimmt (B links; dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 5 Versuchsreihen), Gesamt-IL-12 (B rechts oben; dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs aus 6 Versuchsreihen) und IL-12p70 wurden mittels ELISA gemessen (B rechts unten; dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 6 Versuchsreihen).

Abschließend interessierte hierzu die Wirkung der sequentiellen Stimulation mit CD40-L auf die Expression der Oberflächenmarker. Monozyten wurden entweder nur mit GM-CSF und IL-4 kultiviert oder für die letzten 24 h zusätzlich mit proinflammatorischen Mediatoren stimuliert. Bei einem weiteren Teil der Zellen folgte auf die Stimulation mit den proinflammatorischen Mediatoren für die letzten 12 h eine sequentielle Stimulation mit CD40-L. Unstimulierte Zellen exprimierten den Phänotyp unreifer DCs. Stimulierte Zellen zeigten den Phänotyp voll ausgereifter DCs. Wurden die Zellen zusätzlich mit CD40-L stimuliert, kam es zu einer leichten Erhöhung der Expression von DC-Reife-Markern, wobei diese Erhöhung nur im Fall des Chemokinrezeptors CCR7 statistische Signifikanz erreichte (Abb. 12B, links).

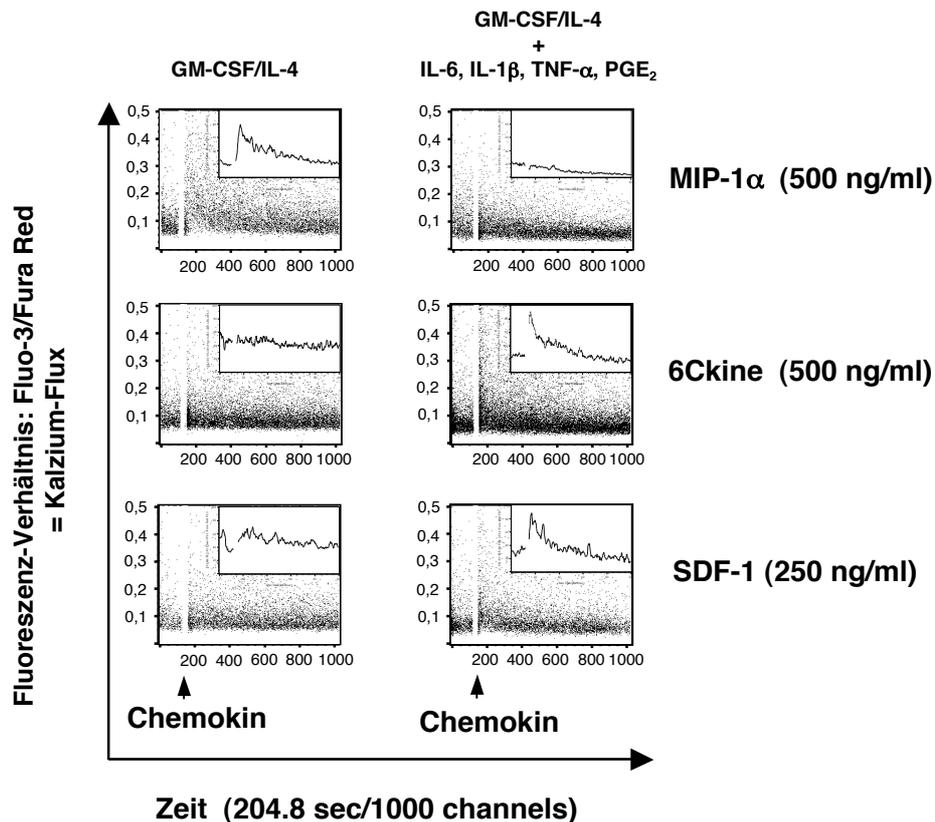
### 3.4 Funktionelle Charakterisierung der *FastDC*

#### 3.4.1 Untersuchung der Reaktion von *FastDC* auf inflammatorische und „lymphoide“ Chemokine

Der Reifeprozess von DCs ist mit einer Änderung der Expression von Chemokinrezeptoren assoziiert (Sozzani et al., 1999). Unreife DCs reagieren auf inflammatorische Chemokine (z.B. MIP-1 $\alpha$ ), die als Reaktion auf einen Entzündungsprozess in den peripheren Organen ausgeschüttet werden. Während ihrer Ausreifung verlieren DCs diese Fähigkeit aufgrund verminderter Expression der entsprechenden Chemokinrezeptoren (z.B. CCR5). Zugleich werden andere Chemokinrezeptoren (z.B. CCR7) hochreguliert, deren Liganden (z.B. 6CKine) vermehrt in den lymphatischen Gefäßen und Organen exprimiert werden. *Stromal cell-derived factor* (SDF-) 1 ist ein konstitutiv exprimiertes Chemokin, das eine wichtige Rolle in der transendothelialen Migration spielen könnte (Zaitseva et al., 2002). Die Stimulation von DCs führt zur erhöhten Expression seines Rezeptors CXCR4, der jedoch in geringerem Maße auch schon auf der Oberfläche unreifer DCs exprimiert wird (Vecchi et al., 1999).

Monozyten wurden entweder für 48 h nur mit GM-CSF und IL-4 kultiviert oder für die letzten 24 h zusätzlich mit proinflammatorischen Mediatoren stimuliert. Wie bereits

beschrieben blieben unstimulierte Zellen nach 48 h Kultur CCR7 negativ, während *FastDC* zu einem hohen Prozentsatz CCR7 exprimierten (Abb. 9A). Die Funktionsfähigkeit der Chemokinrezeptoren wurde durch Bestimmung der intrazellulären Kalzium-Konzentration als Antwort auf verschiedene agonistische Chemokine gemessen.



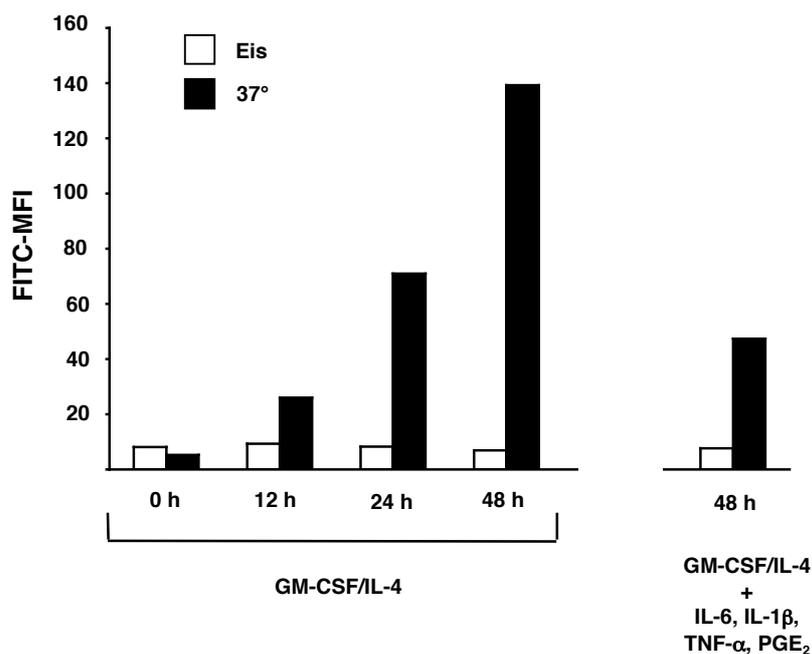
**Abbildung 13: *FastDC* reagieren auf Bindung der CCR7- und CXCR4-Liganden 6CKine und SDF-1 mit Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration.** Monozyten wurden für 48 h entweder nur mit GM-CSF und IL-4 inkubiert oder sie wurden für die letzten 24 h Kultur zusätzlich mit IL-6, IL-1β, TNF-α und PGE<sub>2</sub> stimuliert. Beide Zelltypen wurden in Gegenwart des Detergenz Pluronic F-127 (0,02 %) mit Kalzium-sensitiven Farbstoffen (Fluo-3 und Fura Red) beladen. Daraufhin wurde mittels Analyse des intrazellulären Kalzium-Einstroms ihre Sensitivität auf die Chemokine MIP-1α, 6CKine und SDF-1 getestet. Um das Signal besser sichtbar zu machen ist der Quotient aus Fluo-3 und Fura Red dargestellt. Die Ergebnisse stellen den kinetischen Verlauf des Quotienten dar.

Monozyten, die nur mit GM-CSF und IL-4 inkubiert wurden, reagierten auf das inflammatorische Chemokin MIP-1α, ein Ligand des Chemokinrezeptor CCR5, waren aber nur mäßig empfindlich für den CXCR4-Liganden SDF-1 und unempfindlich für den CCR7-Liganden 6CKine (Abb. 13, links). *FastDC* dagegen verloren die Empfindlichkeit für MIP-1α, reagierten aber auf 6CKine und auf SDF-1 mit einer deutlichen Erhöhung

der intrazellulären Kalzium-Konzentration (Abb. 13, rechts). Diese Tatsache korreliert mit der phänotypischen Ausreifung von *FastDC*. Die Reaktionen von GM-CSF/IL-4-kultivierten DCs verglichen mit *FastDC* auf die verschiedenen Chemokine ähnelte den Reaktionen unreifer moDCs verglichen mit reifen moDCs (Daten nicht gezeigt).

### 3.4.2 Endozytotische Fähigkeiten von *FastDC*

Um die Fähigkeit zur Endozytose löslichen Antigens zu testen, wurden Monozyten entweder für 48 h nur mit GM-CSF und IL-4 kultiviert oder für die letzten 24 h Kultur mit proinflammatorischen Mediatoren stimuliert und zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur (0 h, 12 h, 24 h, 48 h) bei 37°C für 2 h mit FITC-konjugiertem Dextran inkubiert. Die Dextran-Aufnahme wurde mittels FACS-Analyse gemessen.



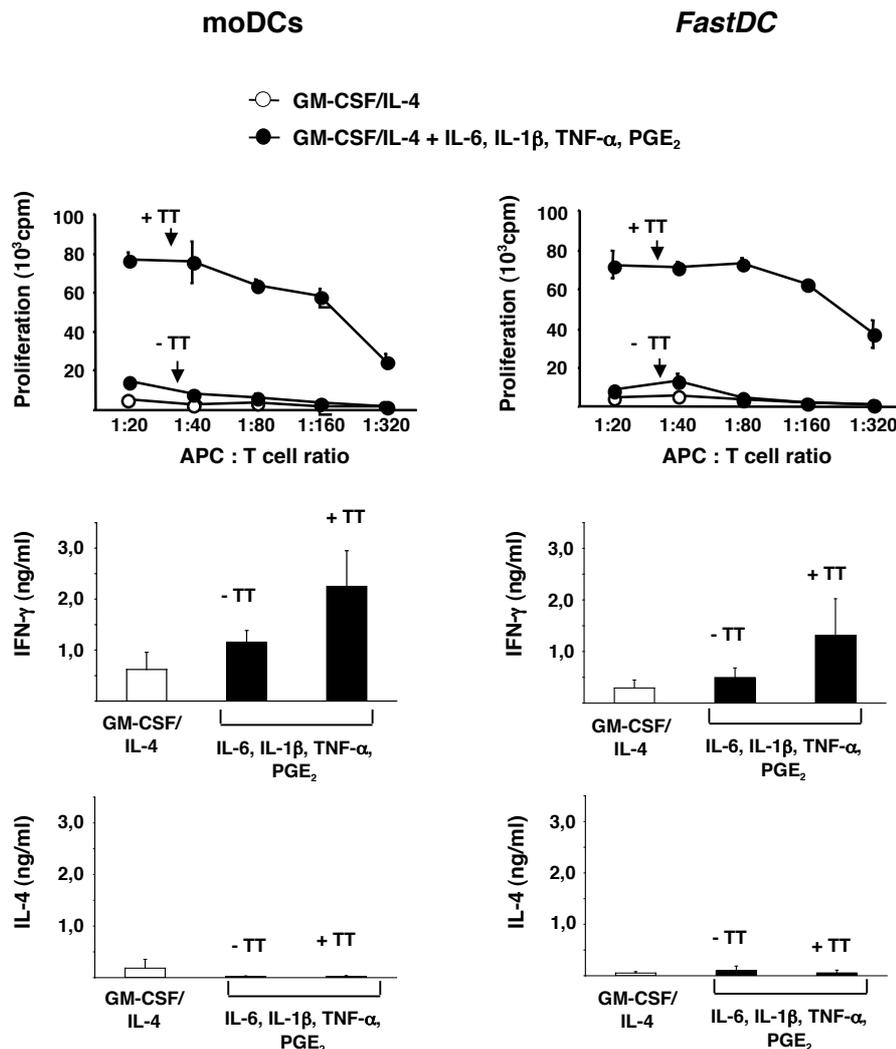
**Abbildung 14: Endozytosekapazität der *FastDC*: Monozyten erhöhen die FITC-Dextran-Aufnahme nach 24 h Kultur mit GM-CSF und IL-4.** Monozyten wurden für 48 h entweder nur mit GM-CSF und IL-4 inkubiert oder sie wurden für die letzten 24 h Kultur zusätzlich mit IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und PGE<sub>2</sub> stimuliert. Während ihres Differenzierungsprozesses wurden die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten im Brutschrank bei 37°C mit FITC-konjugiertem Dextran inkubiert. Nach 2 h wurden die Zellen gewaschen und die Dextran-Aufnahme wurde im FACS als mittlere fluoreszierende Intensität (MFI) gemessen. Als Kontrollen dienten auf Eis inkubierte Zellen.

Bereits nach 12 h Kultur mit GM-CSF und IL-4 konnte eine Zunahme der FITC-Dextran-Aufnahme beobachtet werden. Nach 24 h Kultur konnte eine Erhöhung der mittleren fluoreszierenden Aktivität auf mehr als das 10-fache beobachtet werden, was auf eine deutliche Erhöhung der endozytotischen Aktivität hinweist. Während Monozyten, die nur mit GM-CSF und IL-4 inkubiert wurden, ihre endozytotische Kapazität nach 48 h weiter vergrößert hatten, führte die Aktivierung der Zellen mit proinflammatorischen Mediatoren zu einer deutlichen Reduktion der Aufnahme von löslichem Dextran, was als Ausdruck der DC-Reifung gewertet werden kann (Abb. 14). Als Kontrollen der unspezifischen FITC-Dextran-Bindung dienten jeweils zu denselben Zeitpunkten auf Eis inkubierte Zellen.

#### 3.4.3 Induktion der Proliferation und IFN- $\gamma$ -Sekretion autologer T-Zellen durch Antigen-beladene *FastDC*

Reife DCs sind sehr wirksame Stimulatoren Antigen-spezifischer T-Zell-Antworten. Deshalb wurden als nächstes die T-Zell-stimulierenden Eigenschaften von *FastDC* untersucht und mit moDCs verglichen. Als Modell-Antigen diente hierbei Tetanus-Toxoid-Protein (TT). Um *FastDC* mit Antigen zu beladen, wurden Monozyten während der ersten 24 h Kultur mit GM-CSF und IL-4 zugleich mit TT inkubiert, bevor die Zellen für weitere 24 h mit proinflammatorischen Mediatoren aktiviert wurden. Unreife moDCs wurden an Tag 5 der Kultur mit GM-CSF und IL-4 für 24 h mit TT beladen und dann für weitere 24 h mit proinflammatorischen Mediatoren stimuliert. Sowohl *FastDC* als auch moDCs – entweder mit TT beladen oder unbeladen – wurden nach ihrer Aktivierung mit autologen T-Zellen kokultiviert.

Um eine maximale IL-12-Sekretion der DCs zu erreichen, erfolgte die Kokultivierung der Zellen in Gegenwart von löslichem CD40-L. Monozyten, die jeweils für 2 bzw. 7 Tage nur mit GM-CSF und IL-4 kultiviert wurden, dienten als Kontrollen. Am Tag 5 der Kokultur wurden die Zellen mit radioaktivem [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin gepulst und nach 18 h Inkubation geerntet, um die [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin-Aufnahme und damit die Proliferation der T-Zellen zu messen. Als zusätzliche Kontrolle wurde die Proliferation von reinen T-Zell-Kulturen (ohne DCs) gemessen, die nur  $0.4 \times 10^3$  cpm ausmachte. Sowohl unstimulierte Zellen als auch unbeladene reife DCs zeigten keinen Effekt auf die



**Abbildung 15: Mit Tetanus-Toxoid-Protein beladene *FastDC* induzieren Antigen-spezifische Proliferation und IFN- $\gamma$ -Produktion in autologen T-Zellen.** Monozyten wurden unter Zugabe von TT (5  $\mu$ g/ml) für 24 h mit GM-CSF und IL-4 inkubiert und für weitere 24 h mit IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und PGE<sub>2</sub> stimuliert, um reife Antigen-beladene *FastDC* zu generieren. Um reife Antigen-beladene moDCs zu erhalten, wurden Monozyten für 5 Tage mit GM-CSF und IL-4 inkubiert, für 24 h mit Tetanus-Toxoid-Protein (5  $\mu$ g/ml) beladen und für weitere 24 h mit IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und PGE<sub>2</sub> stimuliert. Als Kontrollen dienten Monozyten, die für 48 h nur mit GM-CSF und IL-4 inkubiert worden waren, unreife moDCs, unbeladene *FastDC* und unbeladene reife moDCs. Die DCs wurden mit autologen T-Zellen kokultiviert (siehe Material und Methoden 2.3.4.2. und 2.3.4.3.). Um die T-Zell-Proliferation zu bestimmen, wurden die Zellen am Tag 5 der Kokultur mit [<sup>3</sup>H]-Thymidin gepulst. Nach 18 h wurde die [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Aufnahme gemessen. In parallelen Versuchsansätzen wurden am Tag 10 der Kokultur die T-Zellen mit DCs restimuliert. Zur Bestimmung der Zytokinproduktion wurden die Überstände der Kokulturen 4 h nach Restimulation geerntet und die IL-4- und IFN- $\gamma$ -Produktion mittels ELISA bestimmt. Die Proliferationsergebnisse zeigen einen repräsentativen Versuch aus 3 Versuchsreihen mit verschiedenen Spendern. Die Ergebnisse der Zytokinmessungen stellen die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus den 3 unabhängigen Versuchsreihen dar.

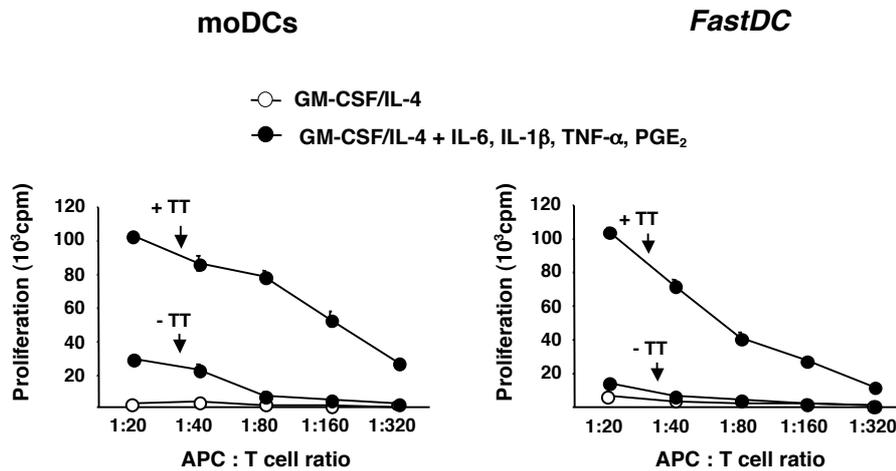
T-Zellen. Dabei war kein Unterschied zwischen moDCs und *FastDC* zu erkennen. Antigen-beladene *FastDC* führten zur Aktivierung der autologen T-Zellen und waren in der Induktion der Proliferation der T-Zellen genauso wirksam wie die Antigen-beladenen moDCs (Abb. 15, oben).

Parallel dazu wurde eine zweite Kokultur autologer T-Zellen mit den verschiedenen DC-Typen (unstimulierte Zellen, beladene oder unbeladene *FastDC* bzw. moDCs) angelegt, um den Typ der hervorgerufenen T-Zell-Antwort zu bestimmen. Nach 10 Tagen Kokultur wurden die T-Zellen mit dem gleichen DC-Typ wie zu Beginn der Kultur restimuliert. Nach 4 h Restimulation wurden die Kulturüberstände geerntet, um Zytokinmessungen durchzuführen. Sowohl Antigen-beladene *FastDC* als auch moDCs induzierten in der Kokultur die Produktion des  $T_H1$ -Zytokins  $IFN-\gamma$  (Abb. 15, mitte). Im Gegensatz dazu induzierten weder *FastDC* noch moDCs die Sekretion des  $T_H2$ -Zytokins IL-4 durch autologe T-Zellen, was darauf schließen lässt, dass *FastDC* genauso wie moDCs eine  $T_H1$ -Antwort hervorrufen (Abb. 15, unten). Im Überstand der Kokultur mit unstimulierten Zellen konnte ebenfalls kein IL-4 gemessen werden, jedoch wurde in geringen Mengen  $IFN-\gamma$  nachgewiesen. Die  $IFN-\gamma$  Sekretion belief sich aber auf ein Drittel (moDCs) bzw. ein Viertel (*FastDC*) der Menge, die durch stimulierte, Antigen-beladene Zellen hervorgerufen wurde. Kokulturen mit stimulierten unbeladenen DCs führten zu einer leichten Erhöhung der  $IFN-\gamma$  Sekretion. Diese erreichte aber sowohl bei *FastDC* als auch bei moDCs maximal die Hälfte des Wertes, der durch stimulierte Antigen-beladene Zellen hervorgerufen wurde.

#### 3.4.4 Aktivierung autologer naiver T-Zellen durch Antigen-beladene *FastDC*

Reife DCs besitzen die einzigartige Fähigkeit, naive T-Zellen zu aktivieren und zur klonalen Proliferation anzuregen (Banchereau et al., 2000). Dieser Vorgang wird als *Priming* bezeichnet. Um diese Fähigkeit bei *FastDC* zu testen, wurden diese wiederum mit TT beladen und diesmal mit autologen, CD45RA-exprimierenden naiven T-Zellen kokultiviert. Der Versuch wurde in direktem Vergleich mit moDCs durchgeführt. Als Kontrollen dienten Kokulturen naiver T-Zellen mit unbeladenen stimulierten *FastDC* bzw. moDCs oder Monozyten, die für 2 bzw. 7 Tage nur mit GM-CSF und IL-4 inkubiert worden waren. Nach 5 Tagen Kokultur unter Zugabe von CD40-L wurde die T-Zell-

Proliferation gemessen. Antigen-beladene *FastDC* führten zur Aktivierung der autologen naiven T-Zellen und waren in der Induktion der Proliferation der T-Zellen genauso wirksam wie Antigen-beladene moDCs. Sowohl unstimulierte Zellen als auch unbeladene reife DCs zeigten keinen Effekt auf die T-Zellen. Dabei war kein Unterschied zwischen moDCs und *FastDC* zu erkennen (Abb. 16).



**Abbildung 16: Mit Tetanus-Toxoid-Protein beladene *FastDC* induzieren Antigen-spezifische Proliferation autologer naiver T-Zellen.** TT-beladene *FastDC* und reife TT-beladene moDCs wurden wie im Text beschrieben generiert. Als Kontrollen dienten Monozyten, die für 48 h nur mit GM-CSF und IL-4 inkubiert worden waren, unreife moDCs, unbeladene *FastDC* und unbeladene reife moDCs. Die DCs wurden mit autologen naiven CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen kokultiviert (siehe Material und Methoden 2.3.4.3.). Um die T-Zell-Proliferation zu bestimmen wurden die Zellen am Tag 5 der Kokultur mit [<sup>3</sup>H]-Thymidin gepulst. Nach 18 h wurde die [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Aufnahme gemessen. Als zusätzliche Kontrolle wurde die Proliferation von reinen T-Zell-Kulturen (ohne DCs) gemessen, die auf nur 0.4 x 10<sup>3</sup> cpm kam. Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs aus 4 Versuchsreihen mit verschiedenen Spendern.

## 4. Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass reife DCs mit voller Kapazität zur T-Zell-Stimulation innerhalb von 48 h aus Monozyten *in vitro* generiert werden können.

In einem ersten Schritt wurden zwei verschiedene Ansätze zur Beschleunigung der DC-Generierung miteinander verglichen. Monozyten wurden nach ihrer Isolation aus PBMZ mit GM-CSF und IL-4 inkubiert und entweder gleich zu Beginn der Kultur oder nach 24 h mit proinflammatorischen Mediatoren stimuliert. Nach insgesamt 48 h Kultur wurden die Zellen aus beiden Ansätzen miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass das zweistufige Modell hinsichtlich der Expression des DC-Reife-Markers CD83 und der Sekretion von IL-12 überlegen war. Dies wurde als *FastDC* definiert.

Innerhalb von 48 h konnten alle Stadien der DC-Differenzierung beobachtet werden. Monozyten, die 48 h nur mit GM-CSF und IL-4 inkubiert wurden, zeigten alle Charakteristika unreifer DCs: die Expression des Monozyten-Markers CD14 auf ihrer Oberfläche verringerte sich, die Fähigkeit zur endozytotischen Aufnahme von löslichem Dextran nahm zu und es kam zur Reaktion auf das inflammatorische Chemokin MIP-1 $\alpha$ . Durch Stimulation nach 24 h entwickelten sich reife DCs, die die Fähigkeit zur Antigenaufnahme verloren hatten. Morphologisch zeichneten sich diese *FastDC* durch die Entwicklung feiner zytoplasmatischer Ausläufer aus. Auf ihrer Oberfläche kam es in hohem Maße zur Neu-Expression des Reifemarkers CD83, zur Erhöhung kostimulierender Moleküle und des Antigen-präsentierenden Moleküls MHC-II sowie zur Expression des Chemokinrezeptors CCR7, dessen Reaktionsfähigkeit auf seinen physiologischen Liganden 6CKine ebenfalls gezeigt werden konnte.

Zur vollen Ausreifung von *FastDC* werden mindestens drei proinflammatorische Mediatoren benötigt: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und PGE<sub>2</sub> zeigten synergistische Wirkung sowohl

bei der Stimulation der Expression der Oberflächenmarker als auch bei der Anregung zur IL-12-Sekretion. Die IL-12-Sekretion konnte durch sequentielle Stimulation mit löslichem CD40-L zusätzlich gesteigert werden. Zur Sekretion des bioaktiven Heterodimers IL-12p70 kam es jedoch nur, wenn die CD40-Ligation in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  stattfand.

*FastDC*, die mit Tetanus-Toxoid-Protein beladen wurden, waren in der Lage, autologe T-Zellen zur Proliferation anzuregen und eine T<sub>H</sub>1-Antwort zu induzieren. Dies zeigte, dass *FastDC* Antigene aufnehmen, prozessieren und effektiv präsentieren können. Die starke proliferative Antwort autologer naiver T-Zellen bewies, dass Antigen-beladene *FastDC* nicht nur Antworten auf Recall-Antigene hervorrufen, sondern auch primäre Immunantworten induzieren können.

## 4.2 Methodendiskussion

### 4.2.1 Geschichte der Entdeckung und Charakterisierung dendritischer Zellen

Langerhans-Zellen (LCs), die DCs der Haut, wurden zum ersten Mal 1868 von Langerhans aufgrund ihrer auffälligen Morphologie beschrieben. Die Zellen besaßen eine unregelmäßige Form mit zahlreichen Zytoplasma-Ausläufern und feinen Fortsätzen. Die Funktion dieser Zellen war lange unbekannt. Erst 1973 wurden durch die Entdeckung der DC in der Milz der Maus durch Steinman und Cohn eine Reihe von Experimenten in Gang gesetzt, die die Funktion von DCs *in vivo* klären konnten. Humane DCs wurden erstmals 1981 beschrieben und kurz darauf direkt aus dem peripheren Blut isoliert. Es wurde gezeigt, dass DCs die einzigartige Fähigkeit zur Stimulation primärer Immunantworten besitzen. Das Interesse an DCs wurde noch größer, als entdeckt wurde, dass Zellen mit LC-ähnlicher Morphologie nicht nur in lymphatischen Organen, sondern auch peripheren Geweben vorkommen und dass sie eine entscheidende Rolle in der Abstoßung transplantierte Organe spielen. Lange Zeit wurden die Experimente dadurch behindert, dass keine spezifischen Oberflächenmarker für DCs bekannt waren. Ihre Unterscheidung von anderen APCs wie Monozyten und Makrophagen wurde deshalb erheblich erschwert und konnte nur

aufgrund morphologischer Kriterien getroffen werden. Außerdem bereitete die Isolation von DCs aus dem peripheren Blut und den Lymphorganen große Schwierigkeiten. Mittlerweile sind verschiedene Protokolle zur Vermehrung von DCs *in vivo* und auch zur Generierung reifer DCs aus Vorläuferzellen *in vitro* bekannt. Auch konnten mehrere für DCs charakteristische Oberflächenmoleküle identifiziert werden (Hart, 1997).

Zunächst wurden DCs direkt aus peripherem Blut oder aus Organen isoliert. Dafür gab es verschiedene alternative Methoden. Ihre Aufreinigung erfolgte entweder über mehrere Adhärenzschritte, über die Depletion kontaminierender Zellen oder mittels Dichtezentrifugation (Williams et al., 1994). Da keine spezifischen DC-Marker bekannt waren, wurden „lineage“-negative Populationen von DCs durch die Depletion anderer Leukozyten, für die spezifische Marker bekannt waren, gewonnen. Alternativ machte man sich die geringe Dichte, die DCs nach einigen Tagen *in vitro* Kultur erlangen, zu Nutze. Die Inkubation von PBMZ bei 37°C im Brutschrank führte zur Aktivierung und damit zur Größen- und Dichteänderung der DCs. Somit konnte die Isolation von DCs über Dichtezentrifugation mit speziellen Dichtemedien erleichtert werden (Hart, 1997). Da DCs im peripheren Blut aber nur etwa 1 % der PBMZ ausmachen, sind diese Methoden mühsam und führen nur zu einer geringen Zellausbeute. Inzwischen gibt es die Möglichkeiten die Bildung sowohl lymphoider als auch myeloider DCs *in vivo* durch Gabe von Flt3-Ligand zu steigern und damit die Isolation der Zellen zu vereinfachen (Lyman et al., 1998; Pulendran et al., 2000; Shurin et al., 1997). Trotz allem wird für die meisten klinischen und experimentellen Fragestellungen bisher die *in vitro*-Generierung von DCs aus Vorläuferzellen bevorzugt.

Zunächst wurden zur Generierung von DCs *in vitro* CD34<sup>+</sup> Stammzellen aus Knochenmark oder aus Nabelschnurblut verwendet, die mit GM-CSF und TNF- $\alpha$  inkubiert wurden (Caux et al., 1992). Parallel wurde weiterhin nach Vorläuferzellen in dem am einfachsten zugänglichen Medium, dem peripheren Blut, gesucht. 1991 stellten Peters et al. die Hypothese auf, dass Monozyten einen Pool zirkulierender Vorläuferzellen für DCs darstellen (Peters et al., 1991). 1994 verwendeten Sallusto und Lanzavecchia erstmals erfolgreich mononukleäre Zellen aus adultem peripherem Blut anstatt Vorläuferzellen aus Knochenmark oder Nabelschnurblut zur Generierung von DCs (Sallusto et al., 1994). Zu diesem Zeitpunkt war allerdings noch nicht geklärt, welche Subpopulation der mononukleären Zellen als Ausgangspunkt für die DCs

diente. Romani et al. stellten 1996 fest, dass die Vorläuferzellen von DCs im peripheren Blut nicht-proliferierende CD34<sup>-</sup> Zellen sind (Romani et al., 1996).

Im selben Jahr wurde von Zhou et al. die Hypothese von Peters bestätigt, dass *in vitro* aus Monozyten reife DCs generiert werden können (Zhou et al., 1996). Inzwischen sind Monozyten die am häufigsten verwendeten Vorläuferzellen für die *in vitro*-Generierung von DCs, da sie viele Vorteile bieten: sie sind in ausreichender Menge im peripheren Blut vorhanden und dadurch leicht, kostengünstig und ohne die Notwendigkeit zur vorausgehenden Zytokinbehandlung des Spenders zu isolieren. Außerdem bilden die entstehenden reifen DCs eine homogene Zellpopulation, die mittlerweile sehr gut charakterisiert ist. Eine weitere Vereinfachung zur Identifikation von DCs bildete die Entdeckung des typischen Reifemarkers CD83, ein Molekül der Ig-Superfamilie, dessen genaue Funktion bis heute nicht geklärt werden konnte (Zhou et al., 1992). Neben morphologischen Kriterien können somit zur Identifizierung von DCs auch phänotypische durchflusszytometrische Kriterien herangezogen werden.

#### 4.2.2 Standardprotokoll zur Generierung dendritischer Zellen aus Monozyten *in vitro*

Grundlage der heute verwendeten Protokolle zur Generierung von DCs aus Monozyten bilden die Experimente, die Sallusto und Lanzavecchia 1994 durchführten (Sallusto et al., 1994). Monozyten wurden mit GM-CSF und IL-4 inkubiert, um unreife DCs zu erhalten. Aufgrund der zu diesem Zeitpunkt mangelnden Kenntnis spezifischer Oberflächenmarker war die Morphologie wichtigstes Kriterium zur Identifikation von DCs. *In vitro* wurden 5 bis 7 Tagen Kultur mit GM-CSF und IL-4 benötigt, bis die Zellen die typische LC-ähnliche Morphologie aufwiesen: die Zellen verloren ihre Fähigkeit zur Adhärenz, schwammen unter Bildung von Zellaggregaten lose im Medium, hatten an Größe zugenommen und bildeten feine Zytoplasmaausläufer (Romani et al., 1994). Die Aktivierung unreifer DCs erfolgte durch Inkubation der Zellen für weitere 24 h mit TNF- $\alpha$  oder CD40-L.

Die ursprüngliche Methode wurde mittlerweile einigen Modifikationen unterzogen: die Isolation kann neben dem Adhärenzschritt auch mit Hilfe von Leukaphrese (Turner

et al., 1999) oder magnetischen Beads durchgeführt werden. Die Verwendung nicht-humaner Proteine wie FCS wird meist vermieden (Bender et al., 1996). Vor dem klinischen Einsatz in der Tumor-Immuntherapie werden DCs heute zur Ausreifung gebracht, da nur reife DCs eine effektive Tumor-spezifische Immunantwort induzieren können (Feuerstein et al., 2000). Reife DCs sind in zytokinfreiem Medium wesentlich stabiler als unreife DCs und behalten für mindestens 48 h nach der Entfernung der Zytokine ihren ursprünglichen Phänotyp. Zur Aktivierung unreifer DCs können verschiedene Stimuli verwendet werden: proinflammatorische Mediatoren, T-Zell-abhängige oder mikrobielle Stimuli (Caux et al., 1994a; Hartmann et al., 1999; Jonuleit et al., 1997; Rescigno et al., 1999).

Als äußerst effektiv und einfach zu handhaben erwies sich der von Jonuleit et al. 1997 eingeführte Cocktail aus den vier verschiedenen proinflammatorischen Mediatoren IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und PGE<sub>2</sub>. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde die Stimulation unreifer DCs mit *Monocyte-conditioned medium* (MCM) durchgeführt. MCM wurde durch die Kultur von Monozyten in mit humanem IgG beschichteten Kulturschalen gewonnen und enthielt proinflammatorische Mediatoren wie IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  (Reddy et al., 1997). Ein Nachteil von MCM war die jedes Mal variierende Konzentration der verschiedenen Mediatoren, die auch eine erhebliche Variation in der Qualität des Mediums nach sich zog. Deshalb entwickelten Jonuleit et al. 1997 einen genau-definierten Cocktail aus vier proinflammatorischen Mediatoren, der sich zur Reife-Induktion unreifer DCs genauso gut eignete wie MCM. Wie die vorliegende Arbeit bestätigt, führt nur eine Kombination mehrerer proinflammatorischer Mediatoren, die PGE<sub>2</sub> enthält, zur vollen phänotypischen Ausreifung von DCs und steigert deren Kapazität zur T-Zell-Stimulation (Jonuleit et al., 1997). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass Zellen, die mit diesem Cocktail stimuliert wurden, im Vergleich zur Aktivierung mit anderen Stimuli gute Überlebensfähigkeit besitzen (Feuerstein et al., 2000).

#### 4.2.3 Monozyten-abgeleitete dendritische Zelle im Vergleich mit *FastDC*

Das heute verwendete Standardprotokoll zur Generierung von DCs aus Monozyten (moDCs) beinhaltet 5 bis 7 Tage Inkubation der Monozyten mit GM-CSF und IL-4

gefolgt von weiteren 24 bis 48 h Stimulation mit proinflammatorischen Mediatoren. MoDCs zeigen alle für DCs charakteristischen Funktionen und haben sich auch in der Tumorummuntherapie als effektiv erwiesen (Nestle et al., 1998; Thurnher et al., 1997). Dennoch stellt sich die Frage, ob dieses Protokoll und vor allem die dafür benötigte Zeitspanne die physiologischen Bedingungen der DC-Entstehung *in vivo* widerspiegelt. Historische Aspekte der DC-Generierung können erklären, warum bisher nur selten versucht wurde, DCs innerhalb kürzerer Zeit zu generieren. Da der charakteristische DC-Aktivierungsmarker CD83 erst relativ spät entdeckt wurde, standen bei der Identifikation unreifer und reifer DCs zunächst morphologische Kriterien im Vordergrund. *FastDC* unterscheiden sich morphologisch von dem für moDCs als Erkennungsmerkmal postuliertem Erscheinungsbild: zwar bilden sie viele feine zytoplasmatische Ausläufer und verlieren während der Ausreifung ihre Adhärenz zur Kulturschale, im Gegensatz zu moDCs nehmen sie aber nicht wesentlich an Größe und Granularität zu und bilden weniger Zellaggregate.

Es konnte sowohl phänotypisch bei der Expression der Oberflächenmarker als auch funktionell bei der Migrationsfähigkeit und den T-Zell-stimulierenden Eigenschaften kein Unterschied zwischen *FastDC* und nach dem Standard-Protokoll generierten moDCs festgestellt werden. Beide exprimierten nach 2 bzw. 7 Tagen Kultur den für reife DCs charakteristischen Immunphänotyp (CD83<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD40<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD80<sup>high</sup>CD86<sup>high</sup>MHC-II<sup>high</sup>), beide bewiesen Reaktionsfähigkeit auf das Lymphknoten-dirigierende Chemokin 6Ckine und beide waren in gleicher Weise in der Lage, eine T<sub>H</sub>1-Antwort in autologen T-Zellen zu induzieren und naive T-Zellen zu *primen* (Banchereau et al., 2000).

Das *FastDC*-Protokoll bietet jedoch gegenüber moDCs auch viele praktische Vorteile: entscheidend ist, dass die Ausbeute reifer DCs aus den initial eingesetzten Monozyten im *FastDC*-Protokoll mindestens doppelt so hoch ist wie im moDC-Protokoll. Es konnten bis zu 2/3 der zu Beginn eingesetzten Monozytenpopulation zu *FastDC* differenziert werden, während der maximale Wert bei moDCs bei 1/3 lag. Dies könnte vor allem bei der Therapie schwerkranker Tumor-Patienten, die zur Generierung ihrer eigenen DCs als Vakzine regelmäßig Blut spenden müssen, von Bedeutung sein. Von großer Wichtigkeit ist auch, dass durch Generierung von *FastDC* verglichen mit der Generierung von moDCs erheblich Geld und Zeit gespart werden kann. Ebenso sind die Zellen aufgrund der kürzeren Kulturdauer weniger anfällig für äußere Störfaktoren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Generierung von *FastDC* in unseren Händen zuverlässiger zu einem hohen Anteil reifer und stabiler DCs führte. Aus praktischen Gesichtspunkten ist daher die Generierung von *FastDC* der Generierung von Standard-moDCs vorzuziehen.

#### 4.2.4 Plastizität der Monozyten

Es ist bekannt, dass Monozyten Vorläuferzellen nicht nur für DCs, sondern auch für Makrophagen darstellen. Werden Monozyten mit GM-CSF oder M-CSF alleine kultiviert, differenzieren sie zu Makrophagen, die morphologisch, phänotypisch und funktionell von DCs unterschieden werden müssen (Palucka et al., 1998). Makrophagen wachsen stärker adhärent und haben meist spindelförmige Gestalt in den Zellkulturen. Im Gegensatz zu DCs zeichnen sie sich phänotypisch durch hohe Expression von CD14 auf ihrer Oberfläche aus, wobei die Expression von CD1a sehr gering ist (Peters et al., 1987). In Anwesenheit des Zytokins IL-4 in der Kultur von GM-CSF-behandelten Monozyten wird die Entwicklung zu Makrophagen unterdrückt, vor allem kommt es zur verminderten Bildung des Oberflächenmarkers CD14 (Peters et al., 1993; Ruppert et al., 1993).

In der vorliegenden Arbeit konnte die Notwendigkeit von IL-4 zur Generierung von DCs aus Monozyten bestätigt werden. Die Zugabe von IL-4 zu GM-CSF-inkubierten Monozyten bewirkte innerhalb der ersten 24 bis 48 h Kultur einen deutlichen Verlust von CD14 auf der Oberfläche der Zellen und die Ausbildung des Immunphänotyps unreifer DCs. Durch Zugabe proinflammatorischer Stimuli in die Kultur konnten nach einer Gesamtkulturdauer von 48 h Zellen mit dem typischen Phänotyp reifer DCs generiert werden, die die Fähigkeit besaßen, IL-12 zu sezernieren und allogene T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Wurden die Monozyten dagegen für 48 h nur mit GM-CSF und proinflammatorischen Mediatoren in Abwesenheit von IL-4 inkubiert, entwickelten sich Zellen mit Makrophagen-ähnlicher Morphologie: die Zellen waren von spindelförmiger Gestalt und zeichneten sich durch starke Adhärenz aus. Im Gegensatz zu mit IL-4 inkubierten Zellen exprimierten sie in hohem Maße CD14 und in nur sehr geringem Maße CD1a und waren weder in der Lage, IL-12 zu sezernieren, noch allogene T-Zellen zu stimulieren.

Nicht nur Monozyten besitzen eine hohe Plastizität, sondern auch Makrophagen und unreife DCs. Die beiden Zelltypen können sich bei Veränderung der Kulturbedingungen ineinander umwandeln. Werden Makrophagen, die nach fünftägiger Kultur von Monozyten mit M-CSF gewonnen wurden, mit GM-CSF und IL-4 in Kultur gegeben, so entwickeln sich innerhalb weniger Tage unreife DCs daraus, die anschließend erfolgreich stimuliert und zur Ausreifung gebracht werden können (Palucka et al., 1998). Umgekehrt kommt es nach Kultur von unreifen DCs, die durch Inkubation von Monozyten mit GM-CSF und IL-4 für 5 Tage generiert wurden, in zytokinfreiem Medium oder unter Zusatz von M-CSF zur Bildung von Makrophagen. Reife DCs dagegen, die zusätzlich für 24 h mit proinflammatorischen Stimuli aktiviert wurden, sind stabil und verlieren nach Entfernung der Zytokine aus dem Medium, selbst nach Zugabe von M-CSF, ihren Phänotyp nicht (Palucka et al., 1998). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass reife DCs eine abschließende Stufe der Differenzierung von Monozyten darstellen.

### 4.3 Eigene Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur

#### 4.3.1 Einfluss verschiedener proinflammatorischer Mediatoren auf die Expression der Oberflächenmarker, Zytokinsekretion und Funktionalität dendritischer Zellen

Mit dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass durch Stimulation mit TNF- $\alpha$  und PGE<sub>2</sub> innerhalb von 2 Tagen voll ausgereifte DCs aus mit GM-CSF und IL-4 inkubierten Monozyten generiert werden können. Einige Effekte proinflammatorischer Mediatoren, die beim Reifungsprozess, der Zytokinsekretion und der Funktionalität von *FastDC* charakterisiert wurden, sind bereits in der Literatur beschrieben.

Keiner der proinflammatorischen Mediatoren war alleine in der Lage, die komplette Ausreifung von DCs aus Monozyten zu induzieren (Romani et al., 1996). Lediglich die Zugabe von PGE<sub>2</sub> zur Zellkultur hatte die Aktivierung einer kleinen Subpopulation zur Folge. Mehrere Publikationen belegen, dass PGE<sub>2</sub> alleine einen relativ schwachen Stimulus darstellt, der jedoch eine Induktion der DC-Reifung bewirken kann. Steinbrink et al. erzielten mit moDCs ähnliche Ergebnisse wie die vorliegende Arbeit mit *FastDC*

(Steinbrink et al., 2000). Die Stimulation von GM-CSF/IL-4-inkubierten Monozyten mit PGE<sub>2</sub> führte zur Erhöhung der Expression kostimulierender Moleküle und zur Bildung einer kleinen Subpopulation, die den DC-Reifemarker CD83 exprimierte.

Zur vollen Ausreifung von DCs kommt es jedoch nur, wenn PGE<sub>2</sub> mit anderen Stimuli kombiniert wird. Zusammen mit TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  induziert PGE<sub>2</sub> nicht nur einen reifen DC-Phänotyp, sondern auch T-Zell-stimulierende Eigenschaften der DCs. Darüber hinaus ist PGE<sub>2</sub> der entscheidende Faktor für die Migration von DCs in die sekundären Lymphorgane. Luft et al. und Scandella et al. konnten zeigen, dass PGE<sub>2</sub> sowohl für die vermehrte Expression der Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR4 verantwortlich ist, als auch für die Erhöhung ihrer Sensitivität gegenüber ihren Liganden 6CKine und SDF-1 (Luft et al., 2002b; Scandella et al., 2002).

Die Auswirkungen von PGE<sub>2</sub> auf die IL-12-Sekretion der DCs und auf den hervorgerufenen Typ der T-Zell-Antwort werden kontrovers diskutiert. Rieser et al. zeigten wie die vorliegende Arbeit eine synergistische Wirkung von PGE<sub>2</sub> mit anderen proinflammatorischen Mediatoren auf die Sekretion von Gesamt-IL-12 (IL-12p40 + IL-12p70) (Rieser et al., 1997). Mehrere Publikationen beschreiben zwar eine erhöhte Sekretion des inaktiven Homodimers IL-12p40, jedoch eine verringerte bzw. unterdrückte Sekretion des bioaktiven Heterodimers IL-12p70 nach zusätzlicher Stimulation mit PGE<sub>2</sub> (Kalinski et al., 2001; Luft et al., 2002b). Es erstaunt deshalb nicht, dass *FastDC*, die mit proinflammatorischen Zytokinen und PGE<sub>2</sub> stimuliert wurden, kein IL-12p70 sezernieren, selbst wenn die Aktivierung in Gegenwart von potenten T-Zell-Stimuli wie CD40-L erfolgt.

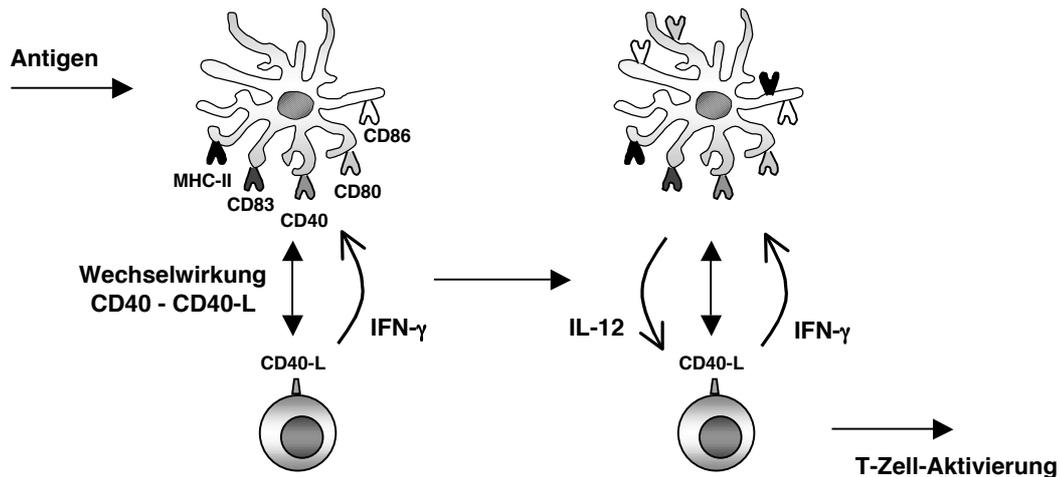
Trotz allem beeinflusste in unseren Experimenten die verringerte IL-12-Sekretion die Fähigkeit der *FastDC* zur Induktion einer potenten T<sub>H</sub>1-Antwort nicht. Dies bestätigte die Ergebnisse von Scandella et al. und Steinbrink et al. mit moDCs (Scandella et al., 2002; Steinbrink et al., 2000). Im Gegensatz dazu wurde von anderen Gruppen beschrieben, dass PGE<sub>2</sub> die Polarisation der T-Zell-Antwort in Richtung T<sub>H</sub>2 bewirkt (Kalinski et al., 1998). Einen Grund für diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten unterschiedliche Kulturbedingungen oder variierende DC/T-Zell-Verhältnisse in den Kokulturen darstellen.

Als weiteren „Schlüssel-Faktor“ für die optimale Aktivierung von *FastDC* konnten wir IL-1 $\beta$  identifizieren. IL-1 $\beta$  zeigte synergistische Wirkung mit PGE<sub>2</sub> auf die phänotypische Ausreifung von DCs und auf die IL-12-Sekretion. Stimulation mit einem Cocktail proinflammatorischer Mediatoren, in dem IL-1 $\beta$  fehlte, führte zu drastisch reduzierter IL-12-Sekretion durch *FastDC*. Kürzlich wurde entdeckt, dass IL-1 $\beta$  in Kombination mit CD40-L die Sekretion von bioaktivem IL-12p70 in moDCs deutlich erhöht (Luft et al., 2002a; Wesa et al., 2001). Diese synergistische Wirkung könnte einen potenten T-Zell-unabhängigen Mechanismus zur DC-Aktivierung während der frühen Phase einer Infektion darstellen.

#### 4.3.2 Das Modell der sequentiellen Stimulation

Mit dem Modell der sequentiellen Stimulation sollten die Verhältnisse, die *in vivo* zur Ausreifung von DCs führen, *in vitro* simuliert werden. Unreife DCs werden im Gebiet der Entzündung zunächst durch lokal ausgeschüttete proinflammatorische Mediatoren, wie TNF- $\alpha$  oder PGE<sub>2</sub>, aktiviert. Zur vollen Aktivierung der DCs kommt es jedoch erst nach Migration der DCs in die T-Zell-reichen Regionen der Lymphknoten, wo DCs und T-Zellen einen gegenseitigen Dialog eingehen. Durch Wechselwirkung zwischen CD40 auf DCs und dessen Ligand CD40-L auf den T-Zellen kommt es zur erhöhten IFN- $\gamma$ -Produktion durch die T-Zellen. Der erhöhte IFN- $\gamma$ -Spiegel seinerseits bewirkt eine weitere Aktivierung der DCs, die sich in der Zunahme der Expression kostimulierender Moleküle und erhöhter IL-12-Sekretion widerspiegelt, welche wiederum zur weiteren Aktivierung der T-Zellen führt (Abb. 17) (Banchereau et al., 1994; Cella et al., 1996; Macatonia et al., 1995; Schuler et al., 2001).

*FastDC* wurden nach 24 h Kultur mit GM-CSF und IL-4 zunächst mit der Kombination aus vier proinflammatorischen Mediatoren stimuliert. Erst nach weiteren 12 h Kultur folgte die Aktivierung durch T-Zell-abhängige Stimuli (Abb. 12A). Hierbei wurde die Wirkung der Stimulation mit CD40-L alleine mit der Kombination aus CD40-L und IFN- $\gamma$ , wie sie auch physiologischerweise bei der DC-T-Zell-Wechselwirkung im Rahmen einer T<sub>H</sub>1-Antwort vorkommt, verglichen.



**Abbildung 17: Dialog zwischen T-Zelle und DC.** Durch Antigenaufnahme aktivierte DCs wandern in die T-Zell-Regionen der Lymphorgane, wo sie über kostimulierende Moleküle in Kontakt mit den T-Lymphozyten treten. Die Wechselwirkung zwischen CD40 und CD40-L bewirkt die erhöhte Sekretion von IFN- $\gamma$  durch die T-Lymphozyten als Ausdruck ihrer Aktivierung. Der erhöhte IFN- $\gamma$ -Spiegel seinerseits bewirkt eine Aktivierung der DC, die sich in der Zunahme der Expression kostimulierender Moleküle und erhöhter IL-12-Sekretion widerspiegelt. Dies wiederum führt zur weiteren Aktivierung der T-Zellen und zur Entwicklung spezifischer T-Effektorzellen.

Durch die alleinige Stimulation mit CD40-L konnte keine IL-12-Sekretion hervorgerufen werden. Erfolgte die Stimulation mit CD40-L nach dem Modell der sequentiellen Stimulation als zusätzliche Aktivierung nach Zugabe der proinflammatorischen Mediatoren, konnte die Produktion von Gesamt-IL-12 in *FastDC* erhöht werden, was möglicherweise ein Hinweis für die synergistische Wirkung von CD40-L und proinflammatorischen Mediatoren bei der Induktion der IL-12-Sekretion ist. Für IL-1 $\beta$  und LPS konnte eine synergistische Wirkung mit CD40-L bei der Induktion der IL-12-Sekretion bereits gezeigt werden (Luft et al., 2002a; Wesa et al., 2001).

Zur Sekretion von bioaktivem IL-12p70 Heterodimer kam es jedoch erst bei sequentieller Stimulation der *FastDC* mit CD40-L in Gegenwart von IFN- $\gamma$ . Die *in vivo* wirkende Kombination T-Zell-abhängiger Aktivatoren stellt also auch *in vitro* die wirksamste Stimulation von *FastDC* dar. Dies steht im Widerspruch zu der von Cella et al. aufgestellten Hypothese, dass CD40-L alleine die IL-12p70-Sekretion beträchtlich stimuliert (Cella et al., 1996; Kalinski et al., 1999). Im Gegensatz dazu bestätigen verschiedene andere Arbeiten, die zeigen konnten, dass für die erfolgreiche Stimulation von DCs neben der Wechselwirkung zwischen DC und T-Zelle über

CD40-L noch weitere T-Zell-abhängige Faktoren wie IFN- $\gamma$  oder IL-4 notwendig sind, die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (Hochrein et al., 2000; Snijders et al., 1998).

#### 4.3.3 Monozyten als Vorläuferzellen dendritischer Zellen *in vivo*

Die vorliegende Arbeit beruht auf der Hypothese, dass *in vivo* im Blut zirkulierende Monozyten einen Pool von Vorläuferzellen von DCs bilden. In der Tat gibt es experimentelle Hinweise, die diese Hypothese bestätigen und zeigen, dass Monozyten im Fall einer Infektion oder Entzündung rasch zu DCs differenzieren können.

Randolph et al. konnten zeigen, dass eine Subpopulation von Monozyten, die mit einschichtigem Endothel kultiviert wurden, innerhalb von 2 Tagen zu reifen DCs differenzierten, v. a. wenn die Monozyten in der subendothelialen Kollagenschicht Partikel phagozytiert hatten. Dieses Modell simuliert den Prozess der Migration von Monozyten aus dem Gewebe über Endothel in lymphatische Gefäße. Nach 1 h Kultur hatte eine Subpopulation der Monozyten das Endothel überquert und war in die subendotheliale Kollagenmatrix ausgewandert. Innerhalb der nächsten 2 Tage überquerte ein Teil dieser Zellen das Endothel zum zweiten Mal und wanderte wieder zurück (reverse Transmigration). Die reverse Transmigration hatte die Induktion eines Reifeprozesses der gewanderten Monozyten zur Folge. Die Zellen, die zusätzlich phagozytische Partikel im Subendothelium aufgenommen hatten, exprimierten nach 48 h den typischen Phänotyp reifer DCs (CD83<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD80<sup>+</sup>CD86<sup>high</sup>MHC-II<sup>high</sup>) (Randolph et al., 1998).

Die Ergebnisse dieses Experiments konnten in einem *in vivo*-Versuch in der Maus bestätigt werden. Die Differenzierung und Wanderung inflammatorischer Monozyten, die subkutan injizierte fluoreszierende Partikel aufgenommen hatten, wurde untersucht. Wie erwartet, entwickelte sich ein Großteil der Zellen zu gewebständigen Makrophagen. 25 % der Zellen wanderte allerdings in die T-Zell-Regionen der Lymphknoten aus und exprimierten typische DC-Reife-Marker und in hohem Maße kostimulierende Moleküle. Da sich die so entstandenen Zellen von den gewebständigen DCs unterschieden und ihre Zahl in Monozyten-defizienten Mäusen

deutlich verringert war, kann die Vermutung geäußert werden, dass eine Subpopulation inflammatorischer Monozyten phagozytierte Partikel in die Lymphknoten transportiert und gleichzeitig zu reifen DCs differenziert (Randolph et al., 1999).

Eine weitere kürzlich erschienene Publikation beschreibt die spontane Reifung CD11c<sup>+</sup> myeloider DCs aus einer Untergruppe von CD14<sup>+</sup> und CD16<sup>+</sup> Monozyten während ihrer Kultur in PBMZ über Nacht (Ho et al., 2002). Die Vermutung, dass die Entstehung von DCs aus Monozyten in Gebieten der Entzündung durch proinflammatorische Mediatoren induziert wird, bestätigt eine Studie an Patienten mit systemischem Lupus erythematoses: Blanco et al. untersuchten aus Patientenblut isolierte Monozyten und zeigten, dass diese *in vitro* Eigenschaften von APCs aufwiesen. Außerdem führte die Kultur normaler Monozyten mit dem stark IFN- $\alpha$ -haltigen Patientenserum zur Differenzierung der Zellen in DCs, die Eigenschaften zur Antigenaufnahme und -präsentation besaßen (Blanco et al., 2001).

All diese Experimente unterstützen nicht nur die in der vorliegenden Arbeit aufgestellte Hypothese, dass Monozyten auch *in vivo* Vorläuferzellen von DCs darstellen, sondern legen auch die Vermutung nahe, dass die Differenzierung innerhalb einer sehr kurzen Zeitspanne ablaufen kann.

#### 4.3.4 Modelle zur beschleunigten Differenzierung dendritischer Zellen aus Monozyten *in vitro*

Der genaue Prozess der Entstehung von DCs *in vivo* und die dazu benötigte Zeitspanne sind nicht bekannt. Die von Randolph et al. durchgeführten Experimente zur reversen Transmigration von Monozyten lassen jedoch vermuten, dass die Differenzierung innerhalb relativer kurzer Zeit verläuft (Randolph et al., 1998).

Neben den hier vorgestellten Ergebnissen bestätigen weitere experimentelle Studien diese Hypothese. Santini et al. verglichen in ihren Experimenten Monozyten, die für 3 Tage entweder mit GM-CSF und IL-4 oder mit GM-CSF und IFN- $\alpha$  inkubiert wurden

(Santini et al., 2000). IFN- $\alpha$  wird in Gebieten der Entzündung von spezialisierten Zellen, wie den Interferon-produzierenden PDCs, gebildet und könnte dort die Entwicklung von DCs aus Monozyten unterstützen. Die mit IFN- $\alpha$  inkubierten Zellen lösten sich im Gegensatz zu den mit IL-4 inkubierten adhären Zellen bereits nach 3 Tagen Kultur vom Boden der Kulturschale und bildeten Zellaggregate, was ein Zeichen für die Zellaktivierung ist. Auch in der Expression der Oberflächenmarker zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Zelltypen. Während die mit IL-4 kultivierten Zellen den Phänotyp unreifer DCs exprimierten (CD14<sup>+</sup>CD83<sup>-</sup>CD80<sup>low</sup>CD86<sup>low</sup>MHC-II<sup>low</sup>), bewirkte die Inkubation mit IFN- $\alpha$  eine zusätzliche Aktivierung der DCs und es kam zur vermehrten Expression kostimulierender Moleküle und von MHC-II. Im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen *FastDC* konnte allerdings nur in einer kleinen Subpopulation von 30 – 40 % der mit IFN- $\alpha$  inkubierten Zellen die de novo Expression von CD83 beobachtet werden. Zur vollen Ausreifung kam es nur nach zusätzlicher Stimulation mit LPS für weitere 2 Tage.

In Bezug auf die Fähigkeit zur Stimulation allogener T-Zellen waren die mit IFN- $\alpha$  inkubierten Zellen den mit IL-4 inkubierten Zellen nach 3 Tagen Kultur auch ohne die Zugabe weiterer Stimuli überlegen. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die schnelle Ausreifung von DCs aus Monozyten möglich ist, auch wenn IFN- $\alpha$  als alleiniger Stimulus nicht ausreicht. Vielmehr liegt die Vermutung nahe, dass IFN- $\alpha$ , dessen Sekretion durch virale Infektionen und andere Stimuli gefördert wird, die Entwicklung von Monozyten in Richtung DC unterstützt. Somit kann diese Studie als weiterer Beweis dafür gesehen werden, dass Monozyten einen Pool an Vorläuferzellen für DCs bilden.

Unsere eigene Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass es durch Zugabe von IL-4 während der Stimulation IFN- $\alpha$ -vorbehandelter Monozyten rasch zur Entwicklung reifer DCs kommt (Dauer et al., 2003). Im Gegensatz zu den von Santini et al. durchgeführten Experimenten führte in unseren Händen die alleinige Behandlung von Monozyten mit GM-CSF und IFN- $\alpha$  zur Hemmung der DC-Differenzierung und zur Entwicklung CD14<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> Makrophagen-ähnlicher Zellen. Die Zellen exprimierten selbst nach Stimulation mit proinflammatorischen Mediatoren keine DC-Aktivierungsmarker. Die Zugabe von IL-4 gleichzeitig mit den Stimulationsfaktoren führte jedoch zur Entwicklung phänotypisch reifer DCs in nur 24 h. Desweiteren erlangten die Zellen die

Fähigkeit zur IL-12-Sekretion und zur Stimulation allogener T-Zellen. Verglichen mit den nach dem Standard-Protokoll generierten DCs, war die Expression der DC-Aktivierungsmarker, die IL-12-Sekretion und die allostimulatorische Kapazität dieser Zellen geringer.

Desweiteren wurde beschrieben, dass Monozyten, die mit CI inkubiert wurden, innerhalb weniger Stunden zu reifen DCs differenzieren (Czerniecki et al., 1997; Koski et al., 1999). Monozyten wurden für 20 h mit GM-CSF inkubiert und anschließend für weitere 20 h mit CI aktiviert. Sowohl die nur mit GM-CSF inkubierten Monozyten als auch die mit CI aktivierten Zellen wurden untersucht. Die dabei erhaltenen Ergebnisse, die belegen, dass die Differenzierung von Monozyten in unreife und reife DCs rasch ablaufen kann, sind mit den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnissen vergleichbar. Die FACS-Analyse zeigte, dass nur mit GM-CSF inkubierte Zellen bereits nach 20 h Kultur den Phänotyp unreifer DCs exprimierten (CD14<sup>-</sup>CD83<sup>-</sup>CD80<sup>low</sup>CD86<sup>low</sup>MHC-II<sup>low</sup>) und die mit CI aktivierten Zellen schon nach 40 h den Phänotyp reifer DCs aufwiesen (CD14<sup>-</sup>CD83<sup>+</sup>CD80<sup>high</sup>CD86<sup>high</sup>MHC-II<sup>high</sup>). Auch zeigten die mit CI generierten DCs die Fähigkeit zur allogenen T-Zell-Stimulation, allerdings wurde eine T<sub>H</sub>2-Antwort hervorgerufen. Verantwortlich dafür ist die fehlende IL-12-Sekretion der mit CI generierten DCs, da wie von Faries et al. beschrieben der Kalzium-Signal-Weg die IL-12-Produktion verringert (Faries et al., 2001).

## 4.4 Klinische Relevanz

### 4.4.1 Dendritische Zellen in der klinischen Immunologie

DCs nehmen eine zentrale Rolle in der Regulation der Immunantworten des Menschen ein. Deshalb wird angenommen, dass sie entscheidend an der Entstehung einiger klinisch-immunologischer Krankheitsbilder beteiligt sind: u.a. an Abstoßung von Transplantaten, Allergie, Autoimmunkrankheiten, Immundefizienz und mangelnde Immunantwort gegenüber Tumoren (Banchereau et al., 2000). Bei einigen Autoimmunkrankheiten wie Psoriasis oder rheumatoider Arthritis wurden in großer Anzahl aktivierte DCs in entzündlich verändertem Gewebe nachgewiesen (Banchereau

et al., 1998). Es wird vermutet, dass DCs ebenso an der Entstehung von Asthma beteiligt sind, da DCs wichtige APCs in der Lunge darstellen. Ihre Beteiligung an der Entstehung von Toleranz und Immunität und bei der Entstehung von Kontaktallergien und Transplantatabstoßung wurde bereits nachgewiesen (Banchereau et al., 1998). Ich möchte mich hier vor allen Dingen mit der Rolle der DCs in der Tumorimmuntherapie, insbesondere der Therapie mittels DC-Vakzinierung, beschäftigen, da dies ein Schwerpunkt unserer Arbeitsgruppe ist.

In den letzten Jahren wurden mehr und mehr tumor-spezifische Antigene identifiziert, welche geeignete Ziele für eine Vakzinierung gegen Tumoren darstellen. Diese Antigene werden von APCs, u.a. auch DCs, aufgenommen, prozessiert und auf MHC-Molekülen präsentiert. Die MHC/Antigen-Komplexe werden von naiven T-Zellen erkannt. Durch die APC-T-Zell-Wechselwirkung wird die Reifung tumor-spezifischer zytotoxischer T-Zellen induziert, welche Antigen-spezifisch Tumorzellen angreifen. DCs als die potentesten APCs sind die idealen Kandidaten für die Induktion und Amplifikation einer primären Immunantwort im Sinne einer Tumor-Vakzinierung.

Obwohl das Immunsystem grundsätzlich die Fähigkeit besitzt neoplastische Zellen zu zerstören, funktioniert die effektive Bekämpfung von Tumoren *in vivo* häufig nicht (Timmerman et al., 1999). Es gibt verschiedene Erklärungsversuche für diese Beobachtung. So wird z.B. angenommen, dass Tumoren durch die Sekretion verschiedener Faktoren, wie VEGF oder IL-10, die Differenzierung und Funktionsfähigkeit von DCs blockieren (Bell et al., 1999; Gabrilovich et al., 1996).

Eine Möglichkeit diese Hemmfaktoren zu umgehen, ist die Generierung von DCs und die Zugabe von Tumorantigenen zu DCs *ex vivo*. Die stimulierten und Antigen-spezifischen DCs können reinfundiert werden und so eine potente Tumor-spezifische Immunantwort hervorrufen (Nestle et al., 1998; Thurnher et al., 1997). Für die Beladung von DCs mit TAAs gibt es zahlreiche unterschiedliche Methoden: Beladung durch Tumorzelllysate, Tumorzell-RNA, virale Vektoren, apoptotische Tumorzellen oder Fusion von DCs mit Tumorzellen (Fong et al., 2000). Trotz Induktion Tumorantigen-spezifischer zytotoxischer T-Zellen kommt es allerdings nur in wenigen Fällen zu klinischem Ansprechen (Fong et al., 2000). Die genauen Ursachen hierfür sind nicht bekannt.

Die Entwicklung einer optimalen Tumorstoffimpfung stellt also weiterhin eine große Herausforderung dar: Wie wird TAA optimal gewonnen? Wie werden die DCs damit beladen? Welche DCs werden für die Stoffimpfung verwendet? Und werden zur Verbesserung des klinischen Ansprechens zusätzliche Adjuvantien benötigt? Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass für die Beladung von DCs mit TAA aus Pankreaskarzinomzellen die Verwendung apoptotischer Tumorzellen der Verwendung von Tumorzelllysat überlegen ist (Schnurr et al., 2002).

#### 4.4.2 *FastDC* bei der Tumorstoffimpfung

*FastDC* besitzen viele Eigenschaften, die eine DC-basierte Stoffimpfung aufweisen muss:

##### (1) Fähigkeit zur Antigenaufnahme

Um eine DC-basierte Stoffimpfung zu generieren, müssen die DCs zunächst mit dem Antigen beladen werden, gegen das die Immunantwort gerichtet werden soll. Damit dies geschehen kann, müssen sie die Fähigkeit zur Antigenaufnahme besitzen. Diese Fähigkeit ist im Stadium der unreifen DC besonders ausgeprägt. Monozyten, die mit GM-CSF und IL-4 alleine inkubiert wurden, entwickelten bereits nach 24 h Kultur typische Eigenschaften unreifer DCs. Durch Zugabe von löslichem FITC-konjugiertem Dextran in die Kultur konnte festgestellt werden, dass die endozytotische Kapazität innerhalb der ersten 24 h bereits um das Zehnfache zunahm. Dies lässt darauf schließen, dass die Antigenaufnahme von *FastDC* während der ersten 24 h Kultur vor ihrer Stimulation sehr effizient und zur Antigenbeladung ausreichend ist (Abb. 14).

##### (2) Antigenpräsentation

Entscheidend ist, dass die Zellen die Antigene nicht nur aufnehmen, sondern auch prozessieren und präsentieren können, damit sie von spezifischen T-Zellen erkannt und damit eine Immunantwort in Gang gesetzt werden kann. Dies wurde der autologen Kokultur von Antigen-beladenen *FastDC* mit T-Zellen bewiesen. Die mit GM-CSF und IL-4 inkubierten Zellen wurden während der ersten 24 h Kultur mit Tetanus-Toxoid-Protein (TT) als Modell-Antigen beladen, bevor sie während der

nächsten 24 h mit proinflammatorischen Mediatoren stimuliert wurden, um ihre Differenzierung in reife DCs zu induzieren. Reife DCs verlieren die Fähigkeit zur Antigenaufnahme – was in dem Experiment zur Messung der FITC-Dextran-Aufnahme auch für *FastDC* bewiesen werden konnte –, ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation und T-Zell-Stimulation nimmt dagegen zu. TT-beladene *FastDC* konnten im Gegensatz zu unbeladenen *FastDC* oder zu unstimulierten Zellen eine starke Antigen-spezifische Proliferation autologer T-Zellen hervorrufen, was beweist, dass TT von *FastDC* nicht nur aufgenommen, sondern auch prozessiert und anschließend präsentiert wurde (Abb. 15).

### (3) T-Zell-Stimulation

Von Bedeutung ist auch die Art der hervorgerufenen Immunantwort. Entscheidend ist hierbei die Fähigkeit der DCs zur IL-12-Sekretion, die für *FastDC* nachgewiesen werden konnte. Insbesondere sind *FastDC* auch in der Lage die bioaktive Form IL-12p70 als Reaktion auf die Stimulation mit den physiologischen T-Zell-Stimuli CD40-L und IFN- $\gamma$  zu sezernieren (Abb. 12B). Dadurch entsteht ein positiver Feedback-Mechanismus, der in der Kokultur von DCs mit T-Zellen ausgenutzt werden kann: *FastDC* bilden IL-12p70 als Reaktion auf die Stimulation mit IFN- $\gamma$ . IL-12p70 wiederum bewirkt die Polarisation der T-Zell-Antwort in Richtung T<sub>H</sub>1 und steigert somit die IFN- $\gamma$ -Sekretion der T-Zellen.

Da eine T<sub>H</sub>1-Antwort entscheidend für die effektive Abwehr von Tumoren ist, wurden in einem weiteren Versuchsansatz autologe T-Zellen mit TT-beladenen *FastDC*, unbeladenen *FastDC* und auch unstimulierten mit GM-CSF und IL-4 inkubierten Monozyten kokultiviert und die Überstände der Kokultur auf typische T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zytokine untersucht. Am 10. Tag der Kokultur wurden die T-Zellen mit dem entsprechenden gleichen DC-Typ restimuliert, um nach 4 h die Zytokine im Überstand zu messen. Nur TT-beladene *FastDC* konnten eine T<sub>H</sub>1-Antwort mit hohen Spiegeln von IFN- $\gamma$  hervorrufen. IL-4 als typisches Zytokin der T<sub>H</sub>2-Antwort wurde in keinem der Überstände gefunden (Abb. 15).

#### (4) T-Zell-Priming

Die einzigartige Eigenschaft der DCs, naive T-Zellen zu stimulieren und damit eine primäre Immunantwort hervorzurufen konnte auch für *FastDC* gezeigt werden. Man kann davon ausgehen, dass TT ein Recall-Antigen darstellte, mit dem die T-Zellen bereits in Kontakt gekommen waren. Naive T-Zellen dagegen sollten noch nicht mit TT in Berührung gekommen sein, so dass zur Untersuchung der Fähigkeit von *FastDC* zum T-Zell-Priming autologe naive T-Zellen isoliert und mit beladenen oder unbeladenen *FastDC* oder mit unstimulierten nur mit GM-CSF und IL-4 inkubierten Monozyten in Kultur gegeben wurden. Nur die mit TT-beladenen *FastDC* konnten Antigen-spezifisch eine Proliferation autologer naiver T-Zellen stimulieren, was die Schlussfolgerung zulässt, dass sie Immunantworten naiver T-Zellen *primen* können (Abb. 16).

#### (5) Migration

DCs müssen, um *in vivo* T-Zellen stimulieren zu können, zuerst in die peripheren lymphatischen Organe auswandern. Je nach Differenzierungsgrad exprimieren DCs auf ihrer Oberfläche unterschiedliche Chemokinrezeptoren und antworten damit auf verschiedene chemotaktische Stimuli. *FastDC* exprimieren auf ihrer Oberfläche in hohem Maße CCR7, dessen Funktionsfähigkeit mittels intrazellulärer Kalzium-Messung nachgewiesen werden konnte. Bindet ein Chemokin an seinen Rezeptor kommt es über Signaltransduktion durch G-Proteine und Phospholipase-C zur Erhöhung des intrazellulären Kalziums. *FastDC* reagierten auf 6CKine, ein Chemokin, das vor allem auf lymphatischen Gefäßen und in der T-Zell-Region der peripheren Lymphorgane exprimiert wird, mit Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration und zeigten damit ihre Kapazität zur Migration an den Ort der T-Zell-Stimulation in den Lymphknoten (Abb. 13).

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass *FastDC* sich grundsätzlich für den Einsatz in der Tumormimmuntherapie eignen. Allerdings wurde bisher nicht überprüft, ob *FastDC* auch Tumorantigen-spezifische zytotoxische T-Zellen induzieren können. Eine letzte wichtige Eigenschaft einer DC-basierten Vakzine ist also:

(6) Hervorrufen einer zytotoxischen T-Zell-Antwort

Dass moDCs tumorspezifische zytotoxische T-Zell-Antworten *in vitro* hervorrufen können, wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits 2001 am Beispiel des Pankreaskarzinoms gezeigt (Schnurr et al., 2001). Inzwischen konnte unsere Arbeitsgruppe diese Eigenschaft auch für *FastDC* bestätigen. *FastDC* wurden während ihrer Differenzierungsphase mit PANC-1 Tumorzellysat als TAA beladen und anschließend mit autologen CD8/CD4-T-Zellen kokultiviert. Nach mehrmaliger Restimulation der T-Zellen konnte mittels ELISPOT ein beträchtlicher Anteil IFN- $\gamma$ -produzierender T-Zellen in den Kokulturen identifiziert werden. Parallel wurde in einem *standard* <sup>51</sup>Cr *release assay* die zytotoxische Aktivität der T-Zellen ermittelt. Es fand eine zytotoxische T-Zell-Antwort statt, bei der PANC-1 spezifisch erkannt und lysiert wurden (Dauer et al., 2005).

*FastDC* besitzen gegenüber den bisher etablierten Protokollen zur *in vitro*-Generierung von DCs erhebliche Vorteile: mit ihrer Generierung kann Arbeit, Zeit und Geld gespart werden, sie sind weniger anfällig für äußere Störfaktoren und erwiesen sich als äußerst stabil und vital. Außerdem führte in unseren Händen die Generierung von *FastDC* aus Monozyten zuverlässig zu einem hohen Anteil reifer homogener DC-Populationen großer Reinheit.

## 5. Zusammenfassung

Dendritische Zellen besitzen die einzigartige Fähigkeit, primäre Immunantworten hervorzurufen. Unreife dendritische Zellen nehmen als Zellen des angeborenen Immunsystems eingedrungene Pathogene auf und wandern daraufhin in die sekundären lymphatischen Organe. Auf ihrem Weg dorthin durchlaufen die dendritischen Zellen einen Reifungsprozess zu Antigen-präsentierenden Zellen, die in den T-Zell-Regionen der regionären Lymphknoten naive Antigen-spezifische T-Zellen aktivieren und zur Proliferation anregen.

Aufgrund ihrer herausragenden Rolle als Regulatoren der Immunantwort sind dendritische Zellen Gegenstand intensiver Forschung. Das heute verwendete Standard-Protokoll zur Generierung dendritischer Zellen *in vitro* wurde 1994 von Sallusto bzw. Romani eingeführt: Monozyten werden für 5 bis 7 Tage mit *granulocyte macrophage colony stimulating factor* und Interleukin-4 inkubiert, um unreife dendritische Zellen zu erhalten. Anschließend folgt eine Aktivierung der Zellen für 24 bis 48 Stunden mit einer Kombination aus proinflammatorischen Mediatoren. Die Hinweise darauf, dass Monozyten auch *in vivo* einen Pool zirkulierender Vorläuferzellen für dendritische Zellen bilden, verdichten sich. Allerdings gibt es Anzeichen dafür, dass die zur Ausreifung benötigte Zeitspanne wesentlich kürzer ist als in dem beschriebenen Standard-*in-vitro*-Protokoll. Mit der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob reife funktionsfähige dendritische Zellen innerhalb kürzerer Zeit aus Monozyten generiert werden können.

Monozyten, die mit *granulocyte macrophage colony stimulating factor* und Interleukin-4 inkubiert werden, entwickeln innerhalb von 24 Stunden die Eigenschaften unreifer dendritischer Zellen: sie zeigen verminderte Expression des Monozytenmarkers CD14, besitzen die Fähigkeit zur Antigenaufnahme und reagieren auf das inflammatorische Chemokin *macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$* . Werden die Zellen nach 24 Stunden Kultur mit *granulocyte macrophage colony stimulating factor* und Interleukin-4 für weitere 24 Stunden mit proinflammatorischen Mediatoren stimuliert, so entwickeln sich nach insgesamt 48 Stunden Kultur reife dendritische Zellen (*FastDC*). *FastDC* haben die Fähigkeit zur Antigenaufnahme verloren, sie exprimieren in hohem Maße den

Reifemarker CD83 und reagieren auf das Lymphknoten-drainierende Chemokin 6CKine. Außerdem besitzen sie die Fähigkeit eine T<sub>H</sub>1-Antwort mit hohen Spiegeln von Interferon- $\gamma$  in autologen T-Zellen zu stimulieren und eine primäre Immunantwort in naiven autologen T-Zellen hervorzurufen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass *in vitro* innerhalb 48 Stunden reife funktionsfähige dendritische Zellen aus Monozyten generiert werden können. Die vorliegende Arbeit unterstützt die Hypothese, dass Monozyten auch *in vivo* Vorläuferzellen dendritischer Zellen darstellen und dass die Differenzierung dendritischer Zellen *in vivo* möglicherweise innerhalb weniger Stunden verläuft. Es wird ein Protokoll beschrieben, das die tägliche Arbeit mit dendritischen Zellen erheblich erleichtert und im Gegensatz zu dem bisherigen Standard-Protokoll wesentliche Vorteile bietet: es werden nicht nur Zeit und Kosten gespart, sondern es wird auch der Einfluss externer Stör-Faktoren auf die Kultur dendritischer Zellen verringert. Außerdem erwies sich die Generierung von *FastDC* in unseren Händen als überlegene Methode, bei der eine größere Zahl vitaler und stabiler dendritischer Zellen generiert werden konnte.

## 6. Literaturverzeichnis

- Adema GJ**, Hartgers F, Verstraten R, de Vries E, Marland G, Menon S, Foster J, Xu Y, Nooyen P, McClanahan T, Bacon KB, Figdor CG. A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature* 1997; 387:713-7.
- 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* 1998a; 188:1359-68.
- Albert ML**, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 1998b; 392:86-9.
- Aliprantis AO**, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 1999; 285:736-9.
- Arnold-Schild D**, Hanau D, Spehner D, Schmid C, Rammensee HG, de la Salle H, Schild H. Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *J Immunol* 1999; 162:3757-60.
- Banchereau J**, Bazan F, Blanchard D, Briere F, Galizzi JP, van Kooten C, Liu YJ, Rousset F, Saeland S. The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:881-922.
- Banchereau J**, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:767-811.
- Banchereau J**, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392:245-52.
- Barton GM**, Beers C, deRoos P, Eastman SR, Gomez ME, Forbush KA, Rudensky AY. Positive selection of self-MHC-reactive T cells by individual peptide-MHC class II complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:6937-42.
- Bell D**, Chomarat P, Broyles D, Netto G, Harb GM, Lebecque S, Valladeau J, Davoust J, Palucka KA, Banchereau J. In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med* 1999; 190:1417-26.
- Bender A**, Bui LK, Feldman MA, Larsson M, Bhardwaj N. Inactivated influenza virus, when presented on dendritic cells, elicits human CD8+ cytolytic T cell responses. *J Exp Med* 1995; 182:1663-71.

- 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.
- Bendriss-Vermare N**, Barthelemy C, Durand I, Bruand C, Dezutter-Dambuyant C, Moulian N, Berrih-Aknin S, Caux C, Trinchieri G, Briere F. Human thymus contains IFN-alpha-producing CD11c(-), myeloid CD11c(+), and mature interdigitating dendritic cells. *J Clin Invest* 2001; 107:835-44.
- Bennett SR**, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 1998; 393:478-80.
- Bevan MJ**. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med* 1976; 143:1283-8.
- Bhardwaj N**, Bender A, Gonzalez N, Bui LK, Garrett MC, Steinman RM. Influenza virus-infected dendritic cells stimulate strong proliferative and cytolytic responses from human CD8+ T cells. *J Clin Invest* 1994; 94:797-807.
- 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.
- Blumberg RS**, Gerdes D, Chott A, Porcelli SA, Balk SP. Structure and function of the CD1 family of MHC-like cell surface proteins. *Immunol Rev* 1995; 147:5-29.
- Brightbill HD**, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin RL. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 1999; 285:732-6.
- Brocker T**, Riedinger M, Karjalainen K. Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med* 1997; 185:541-50.
- Brossart P**, Bevan MJ. Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines. *Blood* 1997; 90:1594-9.
- Buelens C**, Verhasselt V, De Groote D, Thielemans K, Goldman M, Willems F. Human dendritic cell responses to lipopolysaccharide and CD40 ligation are differentially regulated by interleukin-10. *Eur J Immunol* 1997; 27:1848-52.

- Campbell JJ**, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 1998; 279:381-4.
- Castellino F**, Zhong G, Germain RN. Antigen presentation by MHC class II molecules: invariant chain function, protein trafficking, and the molecular basis of diverse determinant capture. *Hum Immunol* 1997; 54:159-69.
- 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.
- Caux C**, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Durand I, Cella M, Lanzavecchia A, Banchereau J. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood* 1997; 90:1458-70.
- Caux C**, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, Banchereau J. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 1994a; 180:1263-72.
- Caux C**, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, Banchereau J. B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 1994b; 180:1841-7.
- 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.
- 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.
- Celluzzi CM**, Mayordomo JI, Storkus WJ, Lotze MT, Falo LD, Jr. Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *J Exp Med* 1996; 183:283-7.
- Chan VW**, Kothakota S, Rohan MC, Panganiban-Lustan L, Gardner JP, Wachowicz MS, Winter JA, Williams LT. Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) is chemotactic for mature dendritic cells. *Blood* 1999; 93:3610-6.
- 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.
- Dauer M**, Hertzen J, Bauer C, Renner F, Schad K, Schnurr M, Endres S, Eigler A. Chemosensitization of Pancreatic Carcinoma Cells to Enhance T Cell-Mediated Cytotoxicity Induced by Tumor Lysate-Pulsed Dendritic Cells. *J Immunother* 2005; 28:332-342.
- 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.
- De Smedt T**, Van Mechelen M, De Becker G, Urbain J, Leo O, Moser M. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol* 1997; 27:1229-35.
- den Haan JM**, Lehar SM, Bevan MJ. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* 2000; 192:1685-96.
- Dhodapkar MV**, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 2001; 193:233-8.
- 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.
- Dieu-Nosjean MC**, Vicari A, Lebecque S, Caux C. Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. *J Leukoc Biol* 1999; 66:252-62.
- Engering AJ**, Cella M, Fluitsma D, Brockhaus M, Hoefsmit EC, Lanzavecchia A, Pieters J. The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *Eur J Immunol* 1997; 27:2417-25.
- Enk AH**, Jonuleit H, Saloga J, Knop J. Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 1997; 73:309-16.
- Faries MB**, Bedrosian I, Xu S, Koski G, Roros JG, Moise MA, Nguyen HQ, Engels FH, Cohen PA, Czerniecki BJ. Calcium signaling inhibits interleukin-12 production and activates CD83(+) dendritic cells that induce Th2 cell development. *Blood* 2001; 98:2489-97.

- 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.
- Fong L**, Engleman EG. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:245-73.
- Gabrilovich DI**, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 1996; 2:1096-103.
- Gallucci S**, Lolkema M, Matzinger P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* 1999; 5:1249-55.
- Galy A**, Travis M, Cen D, Chen B. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 1995; 3:459-73.
- Grouard G**, Risoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 1997; 185:1101-11.
- Gunn MD**, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD, Williams LT. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:258-63.
- Hart DN**. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997; 90:3245-87.
- Hartmann G**, Weiner GJ, Krieg AM. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:9305-10.
- Heath WR**, Carbone FR. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:47-64.
- Ho CS**, Munster D, Pyke CM, Hart DN, Lopez JA. Spontaneous generation and survival of blood dendritic cells in mononuclear cell culture without exogenous cytokines. *Blood* 2002; 99:2897-904.
- 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.

- Hornung V**, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002; 168:4531-7.
- Hsieh SM**, Pan SC, Hung CC, Tsai HC, Chen MY, Lee CN, Chang SC. Kinetics of antigen-induced phenotypic and functional maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2001; 167:6286-91.
- Huang AY**, Golumbek P, Ahmadzadeh M, Jaffee E, Pardoll D, Levitsky H. Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* 1994; 264:961-5.
- Inaba K**, Inaba M, Naito M, Steinman RM. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med* 1993; 178:479-88.
- Inaba K**, Pack M, Inaba M, Sakuta H, Isdell F, Steinman RM. High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J Exp Med* 1997; 186:665-72.
- Inaba K**, Turley S, Yamaide F, Iyoda T, Mahnke K, Inaba M, Pack M, Subklewe M, Sauter B, Sheff D, Albert M, Bhardwaj N, Mellman I, Steinman RM. Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J Exp Med* 1998; 188:2163-73.
- Inaba K**, Witmer-Pack M, Inaba M, Hathcock KS, Sakuta H, Azuma M, Yagita H, Okumura K, Linsley PS, Ikehara S, et al. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med* 1994; 180:1849-60.
- Ingulli E**, Mondino A, Khoruts A, Jenkins MK. In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4(+) T cells. *J Exp Med* 1997; 185:2133-41.
- 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.
- Janeway CA, Jr.**, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:197-216.
- 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.

- 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 conditions. *Eur J Immunol* 1997; 27:3135-42.
- Kadowaki N**, Antonenko S, Liu YJ. Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c- type 2 dendritic cell precursors and CD11c+ dendritic cells to produce type I IFN. *J Immunol* 2001; 166:2291-5.
- Kalinski P**, Schuitemaker JH, Hilkens CM, Kapsenberg ML. Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J Immunol* 1998; 161:2804-9.
- Kalinski P**, Schuitemaker JH, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-gamma and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. *J Immunol* 1999; 162:3231-6.
- 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.
- Kalinski P**, Vieira PL, Schuitemaker JH, de Jong EC, Kapsenberg ML. Prostaglandin E(2) is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer. *Blood* 2001; 97:3466-9.
- Kleijmeer MJ**, Ossevoort MA, van Veen CJ, van Hellemond JJ, Neefjes JJ, Kast WM, Melief CJ, Geuze HJ. MHC class II compartments and the kinetics of antigen presentation in activated mouse spleen dendritic cells. *J Immunol* 1995; 154:5715-24.
- Koski GK**, Schwartz GN, Weng DE, Gress RE, Engels FH, Tsokos M, Czerniecki BJ, Cohen PA. Calcium ionophore-treated myeloid cells acquire many dendritic cell characteristics independent of prior differentiation state, transformation status, or sensitivity to biologic agents. *Blood* 1999; 94:1359-71.
- Kovacsovics-Bankowski M**, Clark K, Benacerraf B, Rock KL. Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:4942-6.

- Kripke ML**, Munn CG, Jeevan A, Tang JM, Bucana C. Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *J Immunol* 1990; 145:2833-8.
- Krug A**, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* 2001; 31:3026-37.
- Kurts C**, Carbone FR, Barnden M, Blanas E, Allison J, Heath WR, Miller JF. CD4+ T cell help impairs CD8+ T cell deletion induced by cross-presentation of self-antigens and favors autoimmunity. *J Exp Med* 1997a; 186:2057-62.
- Kurts C**, Kosaka H, Carbone FR, Miller JF, Heath WR. Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J Exp Med* 1997b; 186:239-45.
- Kuwana M**, Kaburaki J, Wright TM, Kawakami Y, Ikeda Y. Induction of antigen-specific human CD4(+) T cell anergy by peripheral blood DC2 precursors. *Eur J Immunol* 2001; 31:2547-57.
- Larsen CP**, Steinman RM, Witmer-Pack M, Hankins DF, Morris PJ, Austyn JM. Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *J Exp Med* 1990; 172:1483-93.
- Laufer TM**, DeKoning J, Markowitz JS, Lo D, Glimcher LH. Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature* 1996; 383:81-5.
- Liu L**, Rich BE, Inobe J, Chen W, Weiner HL. Induction of Th2 cell differentiation in the primary immune response: dendritic cells isolated from adherent cell culture treated with IL-10 prime naive CD4+ T cells to secrete IL-4. *Int Immunol* 1998; 10:1017-26.
- Liu YJ**, Kanzler H, Soumelis V, Gilliet M. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat Immunol* 2001; 2:585-9.
- Luft T**, Jefford M, Luetjens P, Hochrein H, Masterman KA, Maliszewski C, Shortman K, Cebon J, Maraskovsky E. IL-1 beta enhances CD40 ligand-mediated cytokine secretion by human dendritic cells (DC): a mechanism for T cell-independent DC activation. *J Immunol* 2002a; 168:713-22.
- 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* 2002b; 100:1362-72.
- Lukas M**, Stossel H, Hefel L, Imamura S, Fritsch P, Sepp NT, Schuler G, Romani N. Human cutaneous dendritic cells migrate through dermal lymphatic vessels in a skin organ culture model. *J Invest Dermatol* 1996; 106:1293-9.
- Lyman SD**, Jacobsen SE. c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* 1998; 91:1101-34.
- Macatonia SE**, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wsocka M, Trinchieri G, Murphy KM, O'Garra A. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 1995; 154:5071-9.
- Macatonia SE**, Knight SC, Edwards AJ, Griffiths S, Fryer P. Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies. *J Exp Med* 1987; 166:1654-67.
- Maraskovsky E**, Brasel K, Teepe M, Roux ER, Lyman SD, Shortman K, McKenna HJ. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med* 1996; 184:1953-62.
- Matzinger P**. An innate sense of danger. *Semin Immunol* 1998; 10:399-415.
- McCoy KD**, Hermans IF, Fraser JH, Le Gros G, Ronchese F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) can regulate dendritic cell-induced activation and cytotoxicity of CD8(+) T cells independently of CD4(+) T cell help. *J Exp Med* 1999; 189:1157-62.
- McIlroy D**, Autran B, Cheynier R, Wain-Hobson S, Clauvel JP, Oksenhendler E, Debre P, Hosmalin A. Infection frequency of dendritic cells and CD4+ T lymphocytes in spleens of human immunodeficiency virus-positive patients. *J Virol* 1995; 69:4737-45.
- McWilliam AS**, Napoli S, Marsh AM, Pemper FL, Nelson DJ, Pimm CL, Stumbles PA, Wells TN, Holt PG. Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the inflammatory response to a broad spectrum of stimuli. *J Exp Med* 1996; 184:2429-32.
- McWilliam AS**, Nelson D, Thomas JA, Holt PG. Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. *J Exp Med* 1994; 179:1331-6.

- Medzhitov R**, Janeway C, Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 2000; 173:89-97.
- Mehta-Damani A**, Markowicz S, Engleman EG. Generation of antigen-specific CD8+ CTLs from naive precursors. *J Immunol* 1994; 153:996-1003.
- Moll H**, Fuchs H, Blank C, Rollinghoff M. Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur J Immunol* 1993; 23:1595-601.
- Muzio M**, Natoli G, Sacconi S, Levrero M, Mantovani A. The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp Med* 1998; 187:2097-101.
- 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.
- Nijman HW**, Kleijmeer MJ, Ossevoort MA, Oorschot VM, Vierboom MP, van de Keur M, Kenemans P, Kast WM, Geuze HJ, Melief CJ. Antigen capture and major histocompatibility class II compartments of freshly isolated and cultured human blood dendritic cells. *J Exp Med* 1995; 182:163-74.
- Novak EJ**, Rabinovitch PS. Improved sensitivity in flow cytometric intracellular ionized calcium measurement using fluo-3/Fura Red fluorescence ratios. *Cytometry* 1994; 17:135-41.
- Palucka KA**, Taquet N, Sanchez-Chapuis F, Gluckman JC. Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J Immunol* 1998; 160:4587-95.
- Pamer E**, Cresswell P. Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:323-58.
- Peiser L**, Mukhopadhyay S, Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2002; 14:123-8.
- Peters JH**, Ruhl S, Friedrichs D. Veiled accessory cells deduced from monocytes. *Immunobiology* 1987; 176:154-66.
- Peters JH**, Ruppert J, Gieseler RK, Najjar HM, Xu H. Differentiation of human monocytes into CD14 negative accessory cells: do dendritic cells derive from the monocytic lineage? *Pathobiology* 1991; 59:122-6.
- Peters JH**, Xu H, Ruppert J, Ostermeier D, Friedrichs D, Gieseler RK. Signals required for differentiating dendritic cells from human monocytes in vitro. *Adv Exp Med Biol* 1993; 329:275-80.

- Pfeifer JD**, Wick MJ, Roberts RL, Findlay K, Normark SJ, Harding CV. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* 1993; 361:359-62.
- Pierre P**, Mellman I. Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells. *Cell* 1998; 93:1135-45.
- Pierre P**, Turley SJ, Gatti E, Hull M, Meltzer J, Mirza A, Inaba K, Steinman RM, Mellman I. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 1997; 388:787-92.
- Porcelli SA**, Modlin RL. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:297-329.
- Pulendran B**, Banchereau J, Burkeholder S, Kraus E, Guinet E, Chalouni C, Caron D, Maliszewski C, Davoust J, Fay J, Palucka K. Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J Immunol* 2000; 165:566-72.
- Pulendran B**, Smith JL, Caspary G, Brasel K, Pettit D, Maraskovsky E, Maliszewski CR. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:1036-41.
- Randolph GJ**. Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators. *Semin Immunol* 2001; 13:267-74.
- 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.
- Randolph GJ**, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 1999; 11:753-61.
- Reddy A**, Sapp M, Feldman M, Subklewe M, Bhardwaj N. A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells. *Blood* 1997; 90:3640-6.
- Reis e Sousa C**, Hieny S, Schariton-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, Sher A. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med* 1997; 186:1819-29.
- Reis e Sousa C**, Stahl PD, Austyn JM. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J Exp Med* 1993; 178:509-19.
- Rescigno M**, Granucci F, Citterio S, Foti M, Ricciardi-Castagnoli P. Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. *Immunol Today* 1999; 20:200-3.

- Ridge JP**, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 1998; 393:474-8.
- Rieser C**, Bock G, Klocker H, Bartsch G, Thurnher 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.
- Rissoan MC**, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, Liu YJ. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999; 283:1183-6.
- Rock KL**, Goldberg AL. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:739-79.
- 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.
- 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.
- Ruppert J**, Schutt C, Ostermeier D, Peters JH. Down-regulation and release of CD14 on human monocytes by IL-4 depends on the presence of serum or GM-CSF. *Adv Exp Med Biol* 1993; 329:281-6.
- Saeki H**, Moore AM, Brown MJ, Hwang ST. Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J Immunol* 1999; 162:2472-5.
- 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.
- 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.
- Sallusto F**, Schaerli P, Loetscher P, Scharniel 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.

- Santin AD**, Hermonat PL, Ravaggi A, Chiriva-Internati M, Cannon MJ, Hiserodt JC, Pecorelli S, Parham GP. Expression of surface antigens during the differentiation of human dendritic cells vs macrophages from blood monocytes in vitro. *Immunobiology* 1999; 200:187-204.
- 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.
- Sato T**, Kirimura Y, Mori Y. The co-culture of dermal fibroblasts with human epidermal keratinocytes induces increased prostaglandin E2 production and cyclooxygenase 2 activity in fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1997; 109:334-9.
- Sauter B**, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 2000; 191:423-34.
- Scandella E**, Men Y, Gillessen S, Forster R, Groettrup M. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2002; 100:1354-61.
- Schnurr M**, Galambos P, Scholz C, Then F, Dauer M, Endres S, Eigler A. Tumor cell lysate-pulsed human dendritic cells induce a T-cell response against pancreatic carcinoma cells: an in vitro model for the assessment of tumor vaccines. *Cancer Res* 2001; 61:6445-50.
- Schnurr M**, Scholz C, Rothenfusser S, Galambos P, Dauer M, Robe J, Endres S, Eigler A. Apoptotic pancreatic tumor cells are superior to cell lysates in promoting cross-priming of cytotoxic T cells and activate NK and gammadelta T cells. *Cancer Res* 2002; 62:2347-52.
- Schoenberger SP**, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 1998; 393:480-3.
- Schuler T**, Kammertoens T, Preiss S, Debs P, Noben-Trauth N, Blankenstein T. Generation of tumor-associated cytotoxic T lymphocytes requires interleukin 4 from CD8(+) T cells. *J Exp Med* 2001; 194:1767-75.
- Shen Z**, Reznikoff G, Dranoff G, Rock KL. Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J Immunol* 1997; 158:2723-30.

- Shortman K**, Heath WR. Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells. *Nat Immunol* 2001; 2:988-9.
- Shortman K**, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:151-61.
- Shurin MR**, Pandharipande PP, Zorina TD, Haluszczak C, Subbotin VM, Hunter O, Brumfield A, Storkus WJ, Maraskovsky E, Lotze MT. FLT3 ligand induces the generation of functionally active dendritic cells in mice. *Cell Immunol* 1997; 179:174-84.
- Siegal FP**, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999; 284:1835-7.
- Sigal LJ**, Crotty S, Andino R, Rock KL. Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* 1999; 398:77-80.
- Singh-Jasuja H**, Toes RE, Spee P, Munz C, Hilf N, Schoenberger SP, Ricciardi-Castagnoli P, Neefjes J, Rammensee HG, Arnold-Schild D, Schild H. Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis. *J Exp Med* 2000; 191:1965-74.
- Snijders A**, Kalinski P, Hilkens CM, Kapsenberg ML. High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *Int Immunol* 1998; 10:1593-8.
- Sozzani S**, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, Imai T, Yoshie O, Bonecchi R, Mantovani A. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* 1998; 161:1083-6.
- Sozzani S**, Allavena P, Vecchi A, Mantovani A. The role of chemokines in the regulation of dendritic cell trafficking. *J Leukoc Biol* 1999; 66:1-9.
- 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.
- Spits H**, Couwenberg F, Bakker AQ, Weijer K, Uittenbogaart CH. Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2. *J Exp Med* 2000; 192:1775-84.

- Steinbrink K**, Paragnik L, Jonuleit H, Tuting T, Knop J, Enk AH. Induction of dendritic cell maturation and modulation of dendritic cell-induced immune responses by prostaglandins. *Arch Dermatol Res* 2000; 292:437-45.
- Steinman RM**. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9:271-96.
- Steinman RM**, Turley S, Mellman I, Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 2000; 191:411-6.
- Strobl H**, Riedl E, Scheinecker C, Bello-Fernandez C, Pickl WF, Rappersberger K, Majdic O, Knapp W. TGF-beta 1 promotes in vitro development of dendritic cells from CD34+ hemopoietic progenitors. *J Immunol* 1996; 157:1499-507.
- Strunk D**, Egger C, Leitner G, Hanau D, Stingl G. A skin homing molecule defines the langerhans cell progenitor in human peripheral blood. *J Exp Med* 1997; 185:1131-6.
- Sugita M**, Peters PJ, Brenner MB. Pathways for lipid antigen presentation by CD1 molecules: nowhere for intracellular pathogens to hide. *Traffic* 2000; 1:295-300.
- Svensson M**, Stockinger B, Wick MJ. Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. *J Immunol* 1997; 158:4229-36.
- Takeuchi M**, Kosiewicz MM, Alard P, Streilein JW. On the mechanisms by which transforming growth factor-beta 2 alters antigen-presenting abilities of macrophages on T cell activation. *Eur J Immunol* 1997; 27:1648-56.
- Tanaka H**, Demeure CE, Rubio M, Delespesse G, Sarfati M. Human monocyte-derived dendritic cells induce naive T cell differentiation into T helper cell type 2 (Th2) or Th1/Th2 effectors. Role of stimulator/responder ratio. *J Exp Med* 2000; 192:405-12.
- 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.
- Thurnher 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.
- Timmerman JM**, Levy R. Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Annu Rev Med* 1999; 50:507-29.
- Trinchieri G**. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv Immunol* 1998; 70:83-243.

- Vecchi A**, Massimiliano L, Ramponi S, Luini W, Bernasconi S, Bonecchi R, Allavena P, Parmentier M, Mantovani A, Sozzani S. Differential responsiveness to constitutive vs. inducible chemokines of immature and mature mouse dendritic cells. *J Leukoc Biol* 1999; 66:489-94.
- Verdijk RM**, Mutis T, Esendam B, Kamp J, Melief CJ, Brand A, Goulmy E. Polyriboinosinic polyribocytidylic acid (poly(I:C)) induces stable maturation of functionally active human dendritic cells. *J Immunol* 1999; 163:57-61.
- Villadangos JA**. Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them. *Mol Immunol* 2001; 38:329-46.
- Wesa AK**, Galy A. IL-1 beta induces dendritic cells to produce IL-12. *Int Immunol* 2001; 13:1053-61.
- Williams LA**, Egner W, Hart DN. Isolation and function of human dendritic cells. *Int Rev Cytol* 1994; 153:41-103.
- Young JW**, Szabolcs P, Moore MA. Identification of dendritic cell colony-forming units among normal human CD34+ bone marrow progenitors that are expanded by c-kit-ligand and yield pure dendritic cell colonies in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1995; 182:1111-9.
- Zaitseva M**, Kawamura T, Loomis R, Goldstein H, Blauvelt A, Golding H. Stromal-derived factor 1 expression in the human thymus. *J Immunol* 2002; 168:2609-17.
- 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.
- Zhou LJ**, Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:2588-92.

## 7. Abkürzungen und Akronyme

Abb.	Abbildung
APC	Antigen-präsentierende Zelle
BZR	B-Zell-Rezeptor
CCR	CC-Rezeptoren
CCR7	Chemokinrezeptor 7
CD40-L	CD40-Ligand
CI	Kalzium-Ionophor
CLA	<i>Skin homing receptor</i>
CLIP	<i>Class-II-associated invariant-chain peptide</i>
Cpm	<i>Counts per minute</i>
CXCR	CXC-Rezeptoren
DAG	Diacylglycerin
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FSC	<i>Forwardscatter</i>
G-CSF	<i>Granulocyte colony stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
h	Stunde(n)
HSA	Humanes Serum Albumin
hsp	Hitze-Schock-Protein
IFN	Interferon
li	Invariante Kette
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositoltrisphosphat
IPC	Interferon produzierende Zelle
LCs	Langerhans-Zellen
LPS	Lipopolysaccharid

---

MIICs	MHC-II-Kompartimente
mAbs	Monoklonale Antikörper
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
MCM	<i>Monocyte-conditioned medium</i>
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
Min	Minute(n)
Mio	Million(en)
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
ml	Milliliter
MLR	<i>Mixed lymphocyte reaction</i>
moDCs	Monozyten-abgeleitete DCs
NaCl	Natrium-Chlorid-Lösung
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBMZ	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PDC	Plasmazytoide DC
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositolbisphosphat
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
SDF	<i>Stromal cell-derived factor</i>
SEM	<i>Standard error of mean</i>
SSC	<i>Sidewardscatter</i>
SLC	<i>Secondary lymphoid tissue chemokine</i>
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAP	<i>Transporters associated with antigen processing</i>
TGF β	<i>Transforming growth factor β</i>
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TT	Tetanus-Toxoid-Protein
TZR	T-Zell-Rezeptor
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

## 8. Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Stefan Endres bedanke ich mich für die Überlassung des Themas und die herzliche Aufnahme in seine Abteilung. Besonders bedanken möchte ich mich für die Unterstützung beim Besuch internationaler Kongresse und für die hervorragende Arbeitsatmosphäre innerhalb seiner Abteilung.

Bei meinem Betreuer Dr. Marc Dauer möchte ich mich für die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten und die kontinuierliche Betreuung der Arbeit bedanken. Mein Dank gilt insbesondere auch Herrn PD Dr. Andreas Eigler für seine fachliche Unterstützung und hilfreichen Anregungen. Frau Rosemarie Kiefl und Frau Christiane Haslberger danke ich für ihre Mitarbeit bei der Durchführung der Experimente. Für die gute Zusammenarbeit danke ich Tobias Meskendahl und Katrin Pohl sowie allen Doktoranden in der Abteilung für Klinische Pharmakologie.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und meinem Freund Martin Wöhrl für deren Unterstützung während der Durchführung und Fertigstellung der Arbeit danken.

## 9. Veröffentlichungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen auf folgenden Kongressen vorgestellt und als *Abstract* veröffentlicht:

1. **Bianca Obermaier**, Marc Dauer, Katrin Pohl, Tobias Meskendahl, Julian Röbe, Max Schnurr, Stefan Endres, Andreas Eigler.  
Maturation of dendritic cells from monocytes within 48 hours: a new strategy for dendritic cell generation in vitro.  
*7<sup>th</sup> international Symposium on Dendritic Cells, 2002*  
*Bamberg, Deutschland*
2. **Bianca Obermaier**, Marc Dauer, Jan Herten, Stefan Endres, Andreas Eigler.  
Monocyte-derived dendritic cells for tumor-immunotherapy: differentiation, antigen loading and maturation within 48 hours.  
*Biotherapy of Cancer, Klinikum Großhadern, 2003*  
*München, Deutschland*

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden internationalen Fachzeitschriften als Originalarbeiten veröffentlicht:

1. **Bianca Obermaier**, Marc Dauer, Jan Herten, Katharina Schad, Stefan Endres, Andres Eigler.  
Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes.  
*Biological Procedures Online* 2003;5:197-203. Epub 2003 Oct 24
2. Marc Dauer, **Bianca Obermaier**, Jan Herten, Carola Haerle, Katrin Pohl, Simon Rothenfusser, Max Schnurr, Stefan Endres, Andreas Eigler.  
Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors.  
*Journal of Immunology* 2003 Apr 15;170(8):4069-76  
(Bianca Obermaier steht mit „**contributed equally**“ an zweiter Stelle)
3. Marc Dauer, Katrin Pohl, **Bianca Obermaier**, Tobias Meskendahl, Julian Röbe, Max Schnurr, Stefan Endres, Andreas Eigler.  
Interferon-alpha disables dendritic cell precursors: dendritic cells derived from interferon-alpha-treated monocytes are defective in maturation and T cell stimulation.  
*Immunology* 2003 Sep;110(1):38-47

## 10. Lebenslauf

Bianca Anna Rosa Obermaier  
geboren am 6. April 1978 in München

### Schulbildung

1984 – 1988	Grundschule, München
1988 – 1997	Ludwigsgymnasium, München
1997	Abitur (Note: 1,1)

### Studium

1998 – 2005	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
08/2000	Ärztliche Vorprüfung (Note: 1,33)
08/2001	I. Staatsexamen (Note: 2)
03/2004	II. Staatsexamen (Note: 1,66)
04/2005	III. Staatsexamen (Note: 2)

### Praktisches Jahr (04/2004 – 03/2005)

1. Tertial	Innere Medizin am Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston im Rahmen des PJ-Austauschprogramms der LMU
2. Tertial	Neurologie in der Neurologischen Klinik Großhadern, LMU, München
3. Tertial	Chirurgie in der Chirurgischen Klinik Innenstadt, LMU, München

### Wissenschaftliche Tätigkeit

2001 – 2003	Dissertation bei Herrn Prof. Dr. med. Stefan Endres, Abteilung für Klinische Pharmakologie, Medizinische Klinik Innenstadt, LMU, München
-------------	--

### Stipendien

10/1998 – 12/2005 2004	Bayerische Hochbegabtenförderung PJ-Stipendium der Harvard-Munich-Alliance
---------------------------	---

### Beruf

seit 07/2005	Assistenzärztin in der Neurologischen Klinik Großhadern, LMU, München
--------------	---