

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Untersuchungen zur Interleukin-12 Produktion und zur Migrationsfähigkeit von humanen dendritischen Zellen

Ratzinger, Gudrun

1996

[urn:nbn:at:at-ubi:2-12547](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:at:at-ubi:2-12547)

**UNTERSUCHUNGEN ZUR
INTERLEUKIN-12 PRODUKTION
UND ZUR MIGRATIONSFÄHIGKEIT
VON HUMANEN DENDRITISCHEN ZELLEN**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med. univ.
an der Leopold-Franzens Universität Innsbruck

Erarbeitet im
Immunologischen Labor
der Univ. Klinik für Dermatologie und Venerologie
(Vorstand: o. Univ.-Prof. Dr. Peter Fritsch)
unter der Anleitung von
Univ.-Doz. Dr. Nikolaus Romani

vorgelegt von
Gudrun Ratzinger

Innsbruck, Juni 1996





1996: 05852

Dank

Mein Dank gilt **Herrn o. Univ.-Prof. Dr. Peter Fritsch**, der mir den Arbeitsplatz an der Universitätsklinik für Dermatologie und Venerologie Innsbruck zur Verfügung gestellt hat.

Ganz besonders möchte ich **Herrn Univ.-Doz. Dr. Nikolaus Romani** danken, der mich als mein Betreuer auf sehr nette und hilfsbereite Weise in das Thema einführte, meine Arbeit unterstützte und mich motivierte. Außerdem möchte ich mich für die sehr rasche Korrektur meiner Dissertation bedanken.

Mein Dank gilt außerdem:

Frau Daniela Reider und **Frau Mag. Susanne Ebner** für die Einweisung in das labortechnische Arbeiten und die Auswertungen am FACS-Gerät. Sie waren mir durch ihre Geduld und ihre Ratschläge eine große Hilfe.

Frau Ursula Stanzl für die Unterstützung bei den Auswertungen des ELISAs.

Herrn Dr. Franz Koch für die Einweisung in das Arbeiten mit Versuchstieren.

Mein größter Dank gilt meiner Familie für die Unterstützung während meines gesamten Studiums, meinen Freunden und Kollegen, die meine Studienzeit in Innsbruck um viele Erfahrungen und Erlebnisse bereichert haben und meinem Freund Dr. Tomas Joos für seine Anteilnahme und für die tatkräftige Hilfe am Computer.

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen	5
Glossar	6

I. EINLEITUNG

1. Das System der dendritischen Zellen

A. Charakterisierung	7
B. Vorkommen	9
C. Die Reifung dendritischer Zellen	15
D. Der Lebenszyklus dendritischer Zellen	18
E. Die Rolle dendritischer Zellen während der Immunantwort	19
a. Die Wächterfunktion	20
b. Die migratorische Funktion	22
c. Die adjuvante Funktion	23
F. Wichtige Membranproteine dendritischer Zellen	25

2. Die Rolle von IL-12 in der Immunantwort

A. Entdeckung	27
B. Charakterisierung des IL-12 Moleküls	28
C. Produktion von IL-12	30
D. Biologische Funktionen von IL-12	31
a. Einfluß auf die Hämatopoiese	31
b. Induktion von Zytokinen	31
c. Steigerung der Zell-medierte Zytotoxizität	33
d. Mitogene Effekte an T-Zellen und NK-Zellen	33
E. IL-12 mediiert die Entwicklung von Th 1 Zellen	35
F. Regulation der IL-12 Produktion durch dendritische Zellen	37

3. Migrationsmuster dendritischer Zellen in der Maus

4. Fragestellung

II. MATERIAL UND METHODIK

1. Präparation von dendritischen Zellen aus humanem Blut

A. Material	44
B. Methodik	48

2. Stimulation von dendritischen Zellen zur IL-12 Produktion	
A. Material.....	52
B. Methodik.....	54
C. Nachweis von IL-12 durch ELISA.....	55
3. Nachweis der Migration von humanen DZs in der Maus	57
A. Material.....	57
B. Methodik.....	58

III. RESULTATE

1. Die Gewinnung und Kultivierung von DZs aus humanem Blut	
A. Anteil der dendritischen Vorläuferzellen an den PBMCs	61
B. Unterschiede der verschiedenen Depletionsmethoden	62
C. Einfluß von MCM auf die Reifung der DZs	63
2. Einfluß von Stimulantien auf die IL-12 Produktion dendritischer Zellen	
A. Stimulation durch Anti-CD40-Antikörper	67
B. Stimulation durch SACS	69
C. Unterschied zwischen reifen und unreifen DZs	70
D. Stimulation durch weitere Reagenzien.....	71
3. Nachweis der Migration von humanen DZs im Mausmodell	
A. Wanderung intravenös verabreichter DZs	73
B. Wanderung subkutan verabreichter DZs.....	74

IV. DISKUSSION

1. Einfluß von Stimulantien auf die IL-12-Produktion dendritischer Zellen	
A. Der CD40 Weg der Stimulation	76
B. IL-12 Produktion von reifen und unreifen DZs	78
C. Mögliche Bedeutung der IL-12 Produktion in vivo.....	79
2. Nachweis der Migration von humanen DZs im Mausmodell	
A. Wanderung intravenös verabreichter DZs	80
B. Wanderung subkutan verabreichter DZs.....	80
C. Klinische Relevanz der Migration applizierter DZs	81
Zusammenfassung	82

V. LITERATURVERZEICHNIS	85
--------------------------------------	----

Abkürzungen

APZ	Antigen-präsentierende Zelle
BSA	bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation
DZ	dendritische Zelle
Fc-Rezeptor	Oberflächenrezeptor für das Fc-Fragment der Immunglobuline
GM-CSF	granulocyte/macrophage colony stimulating factor
HLA	human leucocyte antigen
ICAM	intrazelluläres Adhäsionsmolekül
IgG	Immunglobulin gamma
IL	Interleukin
INF-γ	Interferon- γ
LZ	Langerhanszelle
MCM	Monozyten konditioniertes Medium
MHC	major histocompatibility complex
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate buffered saline
SACS	staphylococcus aureus COWAN strain
TNF-α	tumor necrosis factor alpha
U	Unit(s)

Glossar

- R10 Kulturmedium bestehend aus RPMI 1640, 10 % fetalem Kälberserum
50 μ M 2-Mercaptoethanol
20 μ g/ml Gentamicin
200 mM L-Glutamin
- well Vertiefung der Kulturplatte mit einem Fassungsvermögen von
100 μ l bis zu mehreren ml.
Die Anzahl der Vertiefungen/Platte schwankt je nach deren Größe
zwischen 6 und 96.
- Veils schleierförmige Zytoplasmaausstülpungen der dendritischen Zellen
- Cluster Zellaggregate zwischen T-Zellen und reifen dendritischen Zellen

I. EINLEITUNG

1. Das System der dendritischen Zellen

A. Charakterisierung

Dendritische Zellen sind eine Klasse von Leukozyten mit speziellen immunostimulatorischen Eigenschaften (1). Sie stammen aus dem Knochenmark und gehören dem System der Antigen-präsentierenden Zellen an (2). Erstmals wurden sie von Steinman und Cohn 1973 aus Mäusemilzen isoliert (3). Ihren Namen verdanken sie ihrer äußerst charakteristischen Morphologie. Das verzweigte, dendritische Erscheinungsbild ist besonders deutlich bei den dendritischen Zellen der Epidermis, den Langerhanszellen, ausgeprägt (4). Nicht verwechselt werden dürfen sie mit epidermalen Zellen mit ebenfalls dendritischer Morphologie:

- # Melanozyten, die neuroektodermalen Ursprungs sind und sich in der Basalschicht der Epidermis befinden;
- # Merkel-Zellen, die sich ebenfalls in der Basalschicht der Epidermis und auch in den epithelialen Haarwurzelscheiden befinden;
- # Thy-1 positive dendritische Zellen, bei denen es sich um T-Zellen handelt, die einen γ/δ T-Zell-Rezeptor besitzen. Diese konnten im Humansystem nur vereinzelt dargestellt werden, im Maussystem in Abhängigkeit vom Stamm.

Die Identifikation der dendritischen Zellen erfolgt durch eine Kombination von

- morphologischen (3, 4)
- phänotypischen (6, 7) und
- funktionellen (2, 8, 9) Merkmalen.

Gewebebeständige dendritische Zellen zeigen Fortsätze mit rundem Querschnitt, welche Zellorganellen beinhalten. In Kultur ist das Verhalten und die Morphologie dendritischer Zellen einzigartig. Ihre zarten, segelartigen Zytoplasmaausstülpungen

(die sogenannten "veils") verleihen ihnen ein sonnenartiges Aussehen. Diese Ausläufer enthalten keine Zellorganellen und werden ständig ausgestülpt und wieder retrahiert.

Dendritische Zellen exprimieren typischerweise eine große Anzahl von MHC-Klasse I-Molekülen sowie auch MHC-Klasse II-Molekülen auf ihrer Zelloberfläche. Außerdem finden sich verschiedene Adhäsionsmoleküle, wie zum Beispiel ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1, CD 54) und LFA-3 (Leukocyte function associated antigen-3, CD 58). Weiters werden Moleküle mit kostimulatorischer Funktion bei der T-Zellaktivierung exprimiert, wie z.B. B7-1 (CD 80) und B7-2 (CD86).

Es ist von besonderer Wichtigkeit, daß die typischen Makrophagenmarker (unspezifische Esterase, Oberflächen-ATPase, CD 14, CD 68, F4/80 Makrophagenmarker) nicht oder nur in sehr schwachem Maße auf dendritischen Zellen zu finden sind. Dieses Markerprofil weist auf die spezielle immunologische Aufgabe der dendritischen Zellen hin und differenziert sie weitgehend vom Monozyten/Makrophagen-System.

Dendritische Zellen dienen als Antigen-präsentierende Zellen für CD 4+ Helfer-T-Zellen. Sie sind daher entscheidend wichtig für die Auslösung aller T-Zell-abhängigen Immunantworten, wie z.B.

- allergische Reaktionen vom verzögerten Typ (Typ IV) oder Abwehrreaktionen gegen intrazelluläre Bakterien.
- Abstoßung von Organtransplantaten
- Bildung von T-Zell-abhängigen Antikörpern.

Dendritische Zellen sind nach dem heutigen Wissensstand die einzigen Zellen, die die Fähigkeit besitzen, naive T-Zellen, d. h. bisher nicht mit Antigen in Berührung gelangte T-Zellen oder auch ruhende T-Zellen, zu aktivieren. Nur sie sind in der Lage, eine primäre Immunantwort auszulösen. Vor allem dadurch unterscheiden sie sich markant von den bislang als Prototyp der Antigen-präsentierenden Zellen geltenden Makrophagen, aber auch von den B-Lymphozyten und den humanen venulären Endothelzellen, die in bestimmten Situationen ebenfalls als Antigen-präsentierende

Zellen dienen können. Diese Zellen können nur bereits sensibilisierte T-Zellen aktivieren und somit sekundäre Immunantworten auslösen. Bei der primären Immunantwort spielen sie daher keine Rolle.

B. Vorkommen

Seit ihrer erstmaligen Beschreibung wurden dendritische Zellen in verschiedenen lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben sowie auch im Blutkreislauf gefunden.

Das am besten analysierte Organ ist immer noch die murine Milz. In der Zellkultur gehören die dendritischen Zellen typischerweise zur nicht-adhärenenten Fraktion, besonders nach einem Tag in Kultur. Sie exprimieren nur in geringem Ausmaß Fc-Rezeptoren, jedoch in hohem Ausmaß MHC-Klasse II Moleküle. Dadurch kontrastieren sie mit Makrophagen, die die adhärenente Fraktion ausmachen, stark Fc-Rezeptoren und in variablem Ausmaß MHC-Klasse II Moleküle exprimieren (2).

System der dendritischen Zellen

Verteilung	Nomenklatur
Nicht-lymphatische Organe	Langerhanszellen interstitielle dendritische Zellen
Zirkulation	DZ der afferenten Lymphe Blut-dendritische Zellen
Lymphatische Organe	Lymphatische DZ interdigitierende dendritische Zellen

*** Dendritische Zellen in nicht-lymphatischen Organen**

Haut: Dendritische Zellen finden sich in der Haut sowohl in der Epidermis (4, 7) als auch in der Dermis (4, 10, 11). Der in der Epidermis gefundene DZ-Typ ist die Langerhanszelle und stellt die am besten charakterisierte, nicht-lymphatische dendritische Zelle dar.

Die Erstbeschreibung dieser intraepidermalen Zellen mit dendritischer Gestalt erfolgte 1868 in Berlin durch den Medizinstudenten Paul Langerhans. Da sich in seinen mit Goldchlorid gefärbten Hautpräparaten die "Nervenfasern" (Dendriten) bis in die Epidermis fortsetzten, schloß er daraus, daß es sich um Nervenfasern handeln müsse (12). Viele Jahre lang wurden sie dann kaum beachtet, bis sie Anfang der 50er Jahre im Rahmen des neurohormonalen Systems von Wiedmann wieder auftauchten (13). Später wurden die Langerhanszellen als verbrauchte Melanozyten betrachtet.

Erst die Elektronenmikroskopie ermöglichte die Entdeckung einer spezifischen Zytoplasmaorganelle, des Birbeck-Granulums, wodurch die Langerhanszelle endgültig als eigener Zelltyp definiert werden konnte. Das Auffinden dieser Birbeck-Granula in Histozyten im Rahmen der Histozytosis X bewies ihre mesenchymale Natur (14). Nach Auffindung von Oberflächenmolekülen, wie MHC II Molekül, Fc-Rezeptor und Komplementrezeptor, war ihre Natur als immunkompetente Zelle festgelegt. Studien mit Knochenmarks-Chimären (15, 16) bestätigten die Herkunft der Langerhanszelle aus dem Knochenmark und erlaubten somit die Klassifikation als Leukozyten. Die Bestimmung des Phänotyps gelang erst nach Etablierung der Methoden zur Produktion von monoklonalen Antikörpern (17).

K. Wolff stellte als erster epidermale Häutchenpräparate her, wodurch eine quantitative Einschätzung der Verteilung der Langerhanszellen möglich wurde. Die Anzahl der LZ ist abhängig von Alter, Geschlecht, MHC-Haplotyp der Maus und der Körperregion und ist starken Schwankungen unterworfen (10, 19).

Die ersten funktionellen Studien an Langerhanszellen wurden von G. Stingl, S.I. Katz et al durchgeführt. Sie erkannten dabei die Rolle der LZ als Stimulator von prolifera-

tiven und zytotoxischen T-Zellantworten (8, 20). Die klassische Arbeit von Silberberg ließ vermuten, daß den epidermalen dendritischen Zellen bei der Kontaktsensibilisierung eine wesentliche Bedeutung zukommt (18).

Früher zählte man die Linie der Langerhanszellen zum mononukleären phagozytischen System (36, 37). Diese Annahme basierte auf der Beobachtung, daß gewebsständige und frisch isolierte Langerhanszellen Makrophagenmarker exprimieren, wie z. B. Oberflächen-ATPase, nonspezifische Esterase, Fc-Rezeptoren und Komplement-Rezeptoren. Das Oberflächenantigen NLDC-145 oder auch das S 100-Protein sowie die relativ schwache Phagozytosekapazität (34, 38) und das Fehlen von Makrophagenantigenen wie z. B. CD14. (39, 40) machten diese Hypothese auf Dauer unhaltbar. Experimente von Schuler und Romani (38, 40, 44) brachten die Erklärung für diese Diskrepanzen. Durch Kultivierung werden Langerhanszellen zu typischen dendritischen Zellen, wie anhand von morphologischen, phänotypischen und funktionellen Kriterien festgestellt werden kann.

Herz: Fabre, Hart und McKenzie et al. zeigten, daß im Interstitium der meisten Organe, ausgenommen im Zentralnervensystem, unregelmäßig geformte Zellen zu finden sind, die eine starke Expression von MHC-II-Molekülen und CD45 "leukocyte common antigen" aufweisen (21, 22, 23).

Larsen et al. studierten Abstoßungsreaktionen von Herztransplantaten bei Mäusen und fanden, daß die Anzahl der interstitiellen dendritischen Zellen während der ersten vier Tage nach Transplantation stark abfällt (24). Durch die Verwendung von Antikörpern, die spezifisch für Polymorphismen des Spenders waren, konnten MHC-II reiche Spender-DZ in der Milz des Empfängers gefunden werden. Das ist ein Hinweis für die Migration von dendritischen Zellen vom Herzen via die Blutbahn in die Milz.

Zellen gleichen Charakters mit phänotypischer und morphologischer Unterscheidung von Makrophagen und starker Aktivität zur T-Zell-Stimulation lassen sich ausserdem in den Epithelien der **Luftwege**, im Interstitium des **Darms** und der **Leber** finden.

Die in den **Pankreasinseln** vorzufindenden dendritischen Zellen sind für die Abstoßung eines Pankreastransplantates verantwortlich. Dies wurde in einer experimentellen Transplantation von allogenen Inseln gezeigt (25).

* Dendritische Zellen in lymphatischen Organen

Im **Lymphknoten** befinden sich die dendritischen Zellen in den parakortikal gelegenen T-Zellarealen und werden dort als interdigitierende Retikulumzellen bezeichnet. Bei Applikation von murinen Milz-DZ in die Fußpfote oder in den Blutkreislauf beschrieben Austyn et al eine Ansammlung der injizierten Zellen in den T-Zell-Arealen der lymphatischen Organe (26).

In der **Milz** besiedeln die dendritischen Zellen die periarteriolären T-Zellareale (27, 28, 31, 32). In Schnitten kann man deutlich Nester von dendritischen Zellen erkennen, die an der Grenze zwischen T-Zellarealen und der Marginalzone der Makrophagen zu finden sind (29, 30). Sowohl T-Zellen als auch Antigene verlassen die Blutbahn in der Marginalzone. Dendritische Zellen sind wie Tore positioniert, die von den T-Zellen passiert werden müssen, bevor diese in ihre Areale wandern können.

Auch im **Thymus** und in den humanen **Tonsillen** konnten dendritische Zellen definiert werden (31, 32, 33).

*** Dendritische Zellen in der Zirkulation**

Obwohl die Isolierung und Anreicherung (ursprünglich < 0,1 %) schwierig ist, stellt das **Blut** im Humansystem die Hauptquelle für die Gewinnung dendritischer Zellen dar. Sowohl im Blut als auch in der **afferenten Lymphe** kommen dendritische Zellen als "veiled cells" vor (33, 34, 35, 36, 37, 38). Die efferente Lymphe enthält keine "veiled cells".

ZUSAMMENFASSUNG:

Dendritische Zellen verschiedener Herkunft haben folgende charakteristische Merkmale gemeinsam:

1. Sie zeigen die typische dendritische und "veiled" Morphologie.
2. Sie exprimieren in hohem Ausmaß MHC-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche.
3. Sie zeigen starke stimulatorische Kapazität für ruhende T-Lymphozyten in Proliferations-Assays wie zum Beispiel der gemischten Leukozytenreaktion.
4. Die Unterschiede zwischen dendritischen Zellen und Makrophagen werden in der nachfolgenden Tabelle 1.1 anschaulich aufgezeigt.

Tab. 1.1

Vergleiche zwischen lymphoiden dendritischen Zellen und Makrophagen		
Eigenschaft	Dendritische Zellen	Makrophagen
Cytologie		
Form	Aktive Formation von Dendriten, sog. "veils"	sessil
Kern	oval oder irregulär	nierenförmig
Mitochondrien	rund	filamentös
Endoplasm. Retikulum	mehr glattes	mehr rauhes
Endosomen, Lysosomen	wenige	viele
Cytochemie		
Unspezifische Esterase	schwach positiv oder negativ	positiv
Membran-ATPase	negativ	positiv
Alkalische Phosphatase	negativ	positiv
Adhärenz		
in Kultur	schwach oder fehlend	stark
Endozytose		
Phagozytose	schwach oder nicht phagozytisch	aktiv-phagozytisch
Pinozytose	aktiv (Makropinozytose)	sehr aktiv
Membranproteine		
spezifische Zelllinien	33D1, NLDC145; N418	F4/80
Fc-Rezeptoren	schwach oder nicht nachweisbar	hohe Expression
Komplement-Rezeptoren (CD11b/18)	schwach	vorhanden
Leukozytenantigen (CD45)	vorhanden	vorhanden
MHC Klasse I	vorhanden	vorhanden
MHC Klasse II	vorhanden (konstitutiv)	vorhanden (induzierbar)

Aus: Principles of cellular and molecular immunology, Austyn JM, Wood KJ

Es muß jedoch beachtet werden, daß die angegebenen Eigenschaften der dendritischen Zellen in Abhängigkeit ihres Reifungsgrades variieren, z. B. werden Eigenschaften, wie die Fähigkeit zur Makropinozytose oder die Expression von Fc-Rezeptoren im Verlauf der Reifung herabreguliert. Umgekehrt steigt z. B. die Expression von MHC Antigenen mit der Reifung an. (Genauerer siehe nächstes Kapitel.)

Diese Beobachtungen erlauben eine Abtrennung der dendritischen Zellen von dem Monozyten/Makrophagen-System. Eine gemeinsame Vorläuferzelle von Monozyten und dendritischen Zellen ist jedoch wahrscheinlich.

C. Die Beziehung von epidermalen Langerhanszellen zu lymphoiden dendritischen Zellen - Die Reifung dendritischer Zellen

Durch Kultivierung von epidermalen Langerhanszellen für 2 - 3 Tage machen diese eine Reihe von Veränderungen durch, die sie sowohl lymphoiden als auch Blut-DC angleicht (38). Dieser Reifungsprozeß wurde auch für andere Typen von DZ beschrieben, z. B. für Blut-dendritische Zellen

Morphologische Veränderungen:

Wenn Langerhanszellen in Gegenwart von Keratinozyten oder von GM-CSF (granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor) kultiviert werden, nehmen sie die typische Gestalt von aus der Milz isolierten dendritischen Zellen an. Sie entwickeln zahlreiche zytoplasmatische Ausläufer, sog. "veils" und verlieren (Maus) bzw. reduzieren (Mensch) die Birbeck-Granula. Ihr Aussehen wird sowohl im Lichtmikroskop als auch im Elektronenmikroskop ununterscheidbar von denjenigen dendritischen Zellen, die aus muriner Milz oder humanem Blut gewonnen wurden (42, 40, 56). Die

Gewinnungsmethoden für dendritische Zellen aus Blut oder Milz enthielten jedoch auch eine ein- bis zweitägige Kulturperiode.

Phänotypische Veränderungen:

Während der Kultivierung kommt es zu einem starken Anstieg der Expression von MHC-II-Molekülen um das Fünffache (39, 40, 41, 46). Gleichzeitig fällt die Expression von typischen Makrophagenmarkern stark ab, wie z. B. ATPase, nonspezifische Esterase, Fc-Rezeptoren und F4/80 Makrophagen-Antigen (39, 40). Außerdem kann man einen starken Anstieg von Adhäsionsmolekülen beobachten, die in die Interaktionen zwischen T-Lymphozyten und Antigen-präsentierende Zellen involviert sind: ICAM-1 (CD 54) (43, 46, 45), LFA-3 (CD 58) (45), B7-1 (Ligand für CD28), B7-2 (CD86) und MHC-I-Moleküle. Demnach exprimieren epidermale Langerhanszellen, sowohl murine als auch humane, den gleichen Phänotyp wie dendritische Zellen aus Milz oder Blut (39, 40).

Funktionelle Veränderungen:

Frisch isolierte LC sind schwache Stimulatoren von ruhenden T-Lymphozyten. Während der Kultivierung kommt es zu einer starken Zunahme der Stimulationskapazität um das 30-100-fache (38, 44). Außerdem sind Langerhanszellen nach Kultivierung in der Lage, ruhende T-Zellen auf eine Antigen-unabhängige Weise zu binden (44, 45). Diese Tatsache erklärt, zumindest zum Teil, die spezielle Fähigkeit von kultivierten LC und DC, ruhende T-Zellen zu aktivieren (48).

Stingl et al. (8) beobachteten LC als effektive Antigen-präsentierende Zellen für Proteinantigene wie Ovalbumin. Diese Präsentation beinhaltet intrazelluläres Prozessieren, d. h. enzymatische Aufspaltung des Proteins in kleine Peptide und Einbau in den Verband der MHC-II-Moleküle (53, 54). Frische LC sind sehr potente Prozessierer (46, 55), diese Fähigkeit reduzieren sie weitgehend durch die Kultivierung und werden dadurch den aus der Milz gewonnenen DC gleich (47, 56, 58).

Die Funktion des Prozessierens von Proteinen und die Funktion des Stimulierens von T-Zellen sind in frischen und kultivierten Langerhanszellen reziprok exprimiert. Frische LC sind ausgezeichnet im Prozessieren von Antigen (47, 58) aber schwach im Stimulieren von ruhenden T-Zellen. Kultivierte Langerhanszellen sowie auch aus Milz und Blut gewonnene dendritische Zellen verhalten sich genau umgekehrt (38, 40).

Langerhanszelle

Endozytose +++

Immunstimulation ±

Prozessierfähigkeit +++

**Migration als
veiled. Zelle in der
afferenten Lymphe**

**Interdigitierende
Zelle in lymphati-
schen Geweben**

Endozytose ±

Immunstimulation +++

Prozessierfähigkeit ±

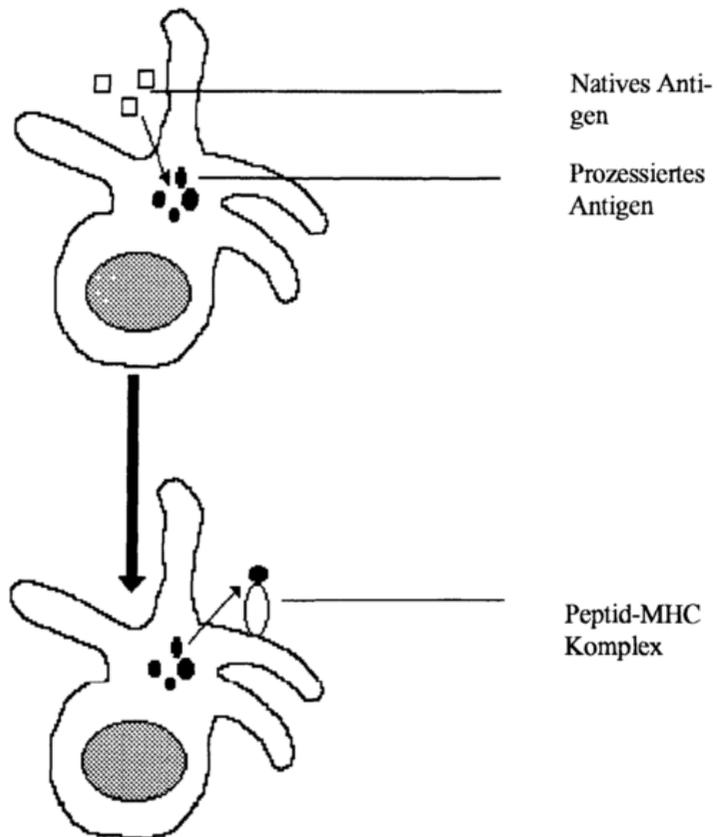


Abbildung 1.1.

aus: Austyn JM, Wood KJ, Principles of Cellular and Molecular Immunology

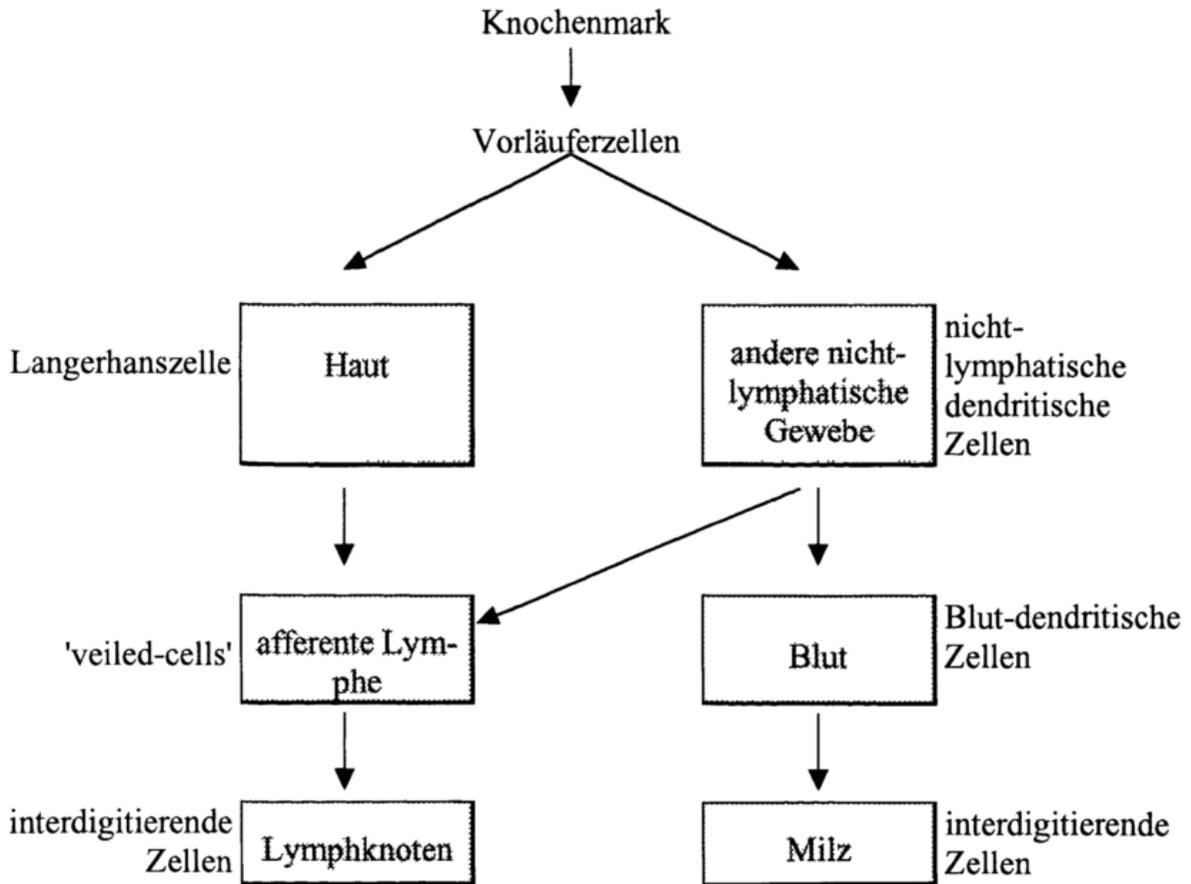
D. Der Lebenszyklus dendritischer Zellen

Der Lebenszyklus der dendritischen Zellen beginnt im Knochenmark. Die Vorläufer wandern in periphere Gewebe, wie z. B. in die Epidermis und befinden sich dort in einem unreifen Zustand. Wahrscheinlich über einen Antigen-Stimulus kommt es zur Auswanderung aus den peripheren Reservoirs. Die dendritischen Zellen gelangen über die afferente Lymphe in die Lymphknoten und über die Blutbahn in die Milz (26, 35, 49), wo sie als reife Zellen ankommen. In der efferenten Lymphe wurden keine dendritischen Zellen gefunden. Daraus schließt man, daß die lymphatischen Organe die Endstation darstellen, und keine Rezirkulation stattfindet.

Ein Teil der interdigitierenden Zellen in den T-Arealen von Lymphknoten und Milz dürften aus der Peripherie eingewanderte dendritische Zellen sein, der andere Teil besteht aus residenten DC, die ihren Reifungsprozeß in den lymphatischen Organen selbst durchmachen.

Es ist bis heute noch nicht ganz aufgeklärt, welche Zytokine die Migration der dendritischen Zellen regulieren. Einige Studien weisen darauf hin, daß die Emigration von Langerhanszellen aus der Epidermis durch TNF- α (Tumor-necrosis-factor alpha) beeinflusst wird (50, 51). Nylander-Lundquist et al. konnten IL-1 β als modulierenden Faktor identifizieren (52).

Eine ebenso wichtige Rolle in der Regulation der Migration spielen auch Adhäsionsmoleküle, deren Expression wiederum von Zytokinen reguliert wird. Aus in vitro Studien ist bekannt, daß die Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen, wie z. B. ICAM-1 (CD54) und LFA-3 (CD58) während der Kultur induziert wird (40, 43).



E. Die Rolle von dendritischen Zellen während der Immunantwort

Dendritische Zellen sind spezialisiert auf die Induktion von primären Immunantworten. Nach Steinman (2) werde ich die Mechanismen, die zu einer spezifischen Immunantwort führen, in drei Funktionsbereiche aufteilen:

- I. DZ als periphere Wachposten des Immunsystems;
Prozessierung und Präsentation des Antigens (Wächterfunktion, "sentinel function")
- II. Die Migration aus der Peripherie ins lymphatische Gewebe sichert das Auffinden von Antigen-spezifischen T-Zellen (Migrationsfunktion)
- III. Dendritische Zellen stimulieren ruhende T-Zellen (Adjuvansfunktion)

I. Die Wächterfunktion der dendritischen Zellen

Periphere unreife dendritische Zellen sind in der Lage, lösliche Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und zu präsentieren. Die Bedeutung dieser Funktion kann gut am Modell der Kontaktallergie demonstriert werden. Durch die Applikation eines niedermolekularen Kontaktallergens wie z. B. DNCB, Oxazolone, Picrylsäure *in vivo* werden intraepidermale Proteine modifiziert und werden somit zum Antigen. Dieses modifizierte Protein wird wie jedes andere Fremdprotein von den LZ zu kurzen immunogenen Peptiden proteolysiert, welche dann in speziellen Organellen in die neu synthetisierten MHC-II-Moleküle eingepaßt werden. Im Anschluß daran werden die neu generierten MHC-II/ Peptidkomplexe auf der Oberfläche der Langerhanszellen exprimiert (53, 54).

Von besonderer Bedeutung für die Antigen-Präsentation ist ein endozytotisches vakuoläres System, das mit großer Wahrscheinlichkeit für die Proteolyse von Fremdproteinen und die Assoziation der Peptide mit MHC-Klasse II-Molekülen verantwortlich ist (57). Diese Annahme wird bestärkt von der Tatsache, daß mit Abnahme der Endosomen im Zuge der Reifung die Prozessierungspotenz der LZ rückläufig ist (56). In umgekehrter Weise verhält sich die Syntheserate der MHC-II-Moleküle (39, 46, 59). Es konnte gezeigt werden, daß LZ, die aus Hapten-behandelter Epidermis isoliert wurden, dieses Antigen in immunogener Form an ihrer Oberfläche exprimieren; damit sind sie in der Lage, Antigen-spezifische T-Zellen zu stimulieren (60).

Die Fähigkeit der DZ, Antigen zu prozessieren und zu präsentieren, wurde *in vivo* durch ein Kontaktallergiemodell bestätigt. Es wurde beobachtet, daß nach epikutaner Applikation von Kontaktallergenen haptenbeladene DZ in den regionalen Lymphknoten erschienen. Hauser et al demonstrierten *in vitro*, daß LZ haptenisierte Antigene aufnehmen können, um sie dann ruhenden T-Zellen zu präsentieren. Nach Transfer dieser stimulierten T-Zellen in normale Mäuse können diese dort eine spezifische Kontaktsensibilisierung induzieren (61). Wird jedoch ein Hapten auf Haut aufgetragen,

deren LZ-Dichte durch vorhergehende Behandlung mit DNFB (Dinitrofluorobenzene) vermindert wurde, so kann keine Kontaktsensibilisierung mehr erfolgen; es kommt zur Toleranzentwicklung (62). Gleiches kann man beobachten, wenn die LZ-Funktion durch vorhergehende UV-B-Bestrahlung gehemmt wurde (43). Wahrscheinlich spielt hier das Zytokin TNF- α eine Rolle (51).

Für den speziellen Fall der Nickelallergie konnte die Gruppe von Sinigaglia (63) zeigen, daß das Nickel-Ion an das Histidin prozessierter, d.h. MHC-gebundener Peptide bindet. Weiterhin konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, daß der therapeutische Effekt von Gold bei der Behandlung der rheumatoiden Arthritis wahrscheinlich über einen ähnlichen Effekt funktioniert. Das Gold lagert sich an den MHC/Peptid-Komplex und stört so die Präsentation des Selbstantigens an die spezifischen T-Zellen. Gleichzeitig kann über den derartig alterierten MHC/Peptid-Komplex die Proliferation von zytotoxischen T-Zellen generiert werden, die eine als Komplikation gefürchtete Typ IV-Reaktion gegen Gold bewirken können.

Über den Einfluß von Zytokinen auf das Prozessieren und Präsentieren von Antigen ist noch wenig bekannt. Es wäre jedoch ein Einfluß der Zytokine TNF- α (Tumornecrosis-factor alpha), Interferon γ und Interleukin 4 zu erwarten, da sie einen Einfluß auf die Biosynthese der MHC-Moleküle haben (64, 65, 66, 67). Einige Experimente weisen jedoch eher auf eine hemmende Rolle des TNF- α hin. Durch TNF- α kommt es zu einer Hemmung der Präsentationsfähigkeit, die wahrscheinlich auf einen Verlust bereits prozessierter immunogener Peptide aus der Peptidbindungsgrube des MHC-II-Moleküls zurückzuführen ist (68). Vermeer und Streilein konnten in vivo zeigen, daß die intradermale Injektion von TNF- α Kontaktsensibilisierung verhindert, so wie dies nach UV-B-Bestrahlung der Fall war (51).

Durch diese Untersuchungen scheint die Wachpostenfunktion der epidermalen dendritischen Zellen, im besonderen was die Kontaktsensibilisierung betrifft, wahrscheinlich. Dermale DZ haben möglicherweise eine unterstützende Funktion (70).

II. Die migratorische Funktion der dendritischen Zellen

Antigene treffen primär auf Oberflächenepithelien oder auf darunterliegende Bindegewebe. Somit liegen die unreifen dendritischen Zellen strategisch günstig in der Epidermis, um Antigene aufzunehmen und zu prozessieren.

Die beladenen LZ wandern anschließend über die afferenten Lymphgefäße in die parakortikalen T-Zellareale der Lymphknoten, wo sie T-Zellen auffinden, die spezifisch zu ihnen passen und in der Lage sind, Immunität zu induzieren. Diese Wanderung ist nötig, weil die T-Zell-Dichte in der Haut sehr niedrig ist. Dieses Erkenntnis stammt aus Hauttransplantationsstudien (71) und Kontaktsensibilisierungsstudien (78), die gezeigt haben, daß die afferenten Lymphgefäße intakt sein müssen, um eine immunologische Reaktion zu erhalten. Die in den Lymphknoten angelangten reifen dendritischen Zellen sind ident mit den interdigitierenden Retikulumzellen. Die Mechanismen, die dieses homing bewirken, sind relativ unbekannt. Verschiedene Adhäsionsmoleküle (ICAM-1/CD 54, LFA-3/CD 58), die auf den heranreifenden LZ vermehrt ausgebildet werden, dürften dabei eine Rolle spielen (73, 74, 75, 76). Auch das E-Cadherin-Molekül, das auf heranreifenden LZ herabreguliert wird, könnte eine Rolle spielen.

Es gibt einige Studien, die das Wanderverhalten dendritischer Zellen nachweisen:

- Die Applikation von Kontaktallergenen führt zu einer Abnahme der LZ-Zahl in der Epidermis um ein Drittel (78, 79)
- Larsen zeigte in einem Organkulturmodell, daß die Anzahl der LZ in der Epidermis sich vermindert, während die MHC-II positiven Zellen in der Dermis zunehmen. Nach drei Tagen waren typisch aussehende DZ aus dem Organ ins Medium gewandert (80).
- Nach epikutaner Kontaktsensibilisierung erkennt man eine Zunahme von DZ in den abfließenden Lymphgefäßen und in den regionalen Lymphknoten (81, 82).

Inwieweit Zytokine die Migration beeinflussen, ist noch relativ unbekannt. In letzter Zeit summieren sich jedoch die Hinweise, daß TNF- α eine Schlüsselrolle zukommt:

- * Durch intradermale Injektion von TNF- α kommt es einer Abnahme von LZ in den angefertigten Epidermalsheets (51).
- * Nach intradermaler Injektion von TNF- α beobachtet man einen erhöhten Influx von DZ in den versorgenden regionalen Lymphknoten (50) und eine Abnahme der LZ in der Epidermis (77).
- * Nach Applikation von Irritantien und sensibilisierenden Substanzen kommt es zu einem Anstieg der epidermalen Zytokinproduktion. Die PCR (Polymerase-chain-reaction)-Analyse zeigte einen Anstieg von TNF- α und GM-CSF. Spezifisch nach Applikation von sensibilisierenden Substanzen kommt es zu einem Anstieg der mRNA für IL-1- α in Keratinozyten und für IL-1- β in LZ, für Interferon-induziertes Protein 10 (IP-10) und Makrophagen-inflammatorisches Protein 1 α und 2 (MIP 1 α und 2) (83, 84).

III. Die adjuvante Funktion der dendritischen Zellen

Die Migration der dendritischen Zellen in die Lymphknoten ist sinnvoll und notwendig, weil nur dort eine realistische Chance besteht, die für die jeweiligen MHC/-Peptid- bzw. MHC/Peptid/Hapten-Komplexe spezifischen T-Zellklone aufzufinden. Sind die T-Zellen stimuliert, proliferieren sie und produzieren Zytokine. Die Aktivierung der passenden T-Zellen erfolgt in drei Schritten (85):

1. Reife dendritische Zellen, wie sie nach der Migration in den Lymphknoten zu finden sind, sind fähig, ruhende T-Zellen in einer Antigen-**un**abhängigen Weise in relativ stabilen aber reversiblen Aggregaten zu binden (44, 45, 86). Auf diese Weise kann aus einem großen Angebot von T-Zellen die mit dem passenden T-Zell-Rezeptor herausgefunden werden. Das Phänomen der Bildung von großen Zellaggregaten ("cluster"-Bildung) kann im Phasenkontrastmikroskop gut beobachtet werden. Die molekularbiologischen Mechanismen für dieses Phänomen sind bis jetzt noch nicht nicht bekannt. Wahrscheinlich aber spielt die Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle im Rahmen des Reifungsprozesses der dendritischen Zel-

len eine Rolle. Das Antigen-unspezifische "clustering" kann nur bei reifen dendritischen Zellen und nicht bei anderen APZ beobachtet werden (6, 40, 42, 86)

2. Nach erfolgreicher Suche nach dem passenden T-Zellrezeptor erfolgt nun als nächster Schritt die **Antigen-spezifische** DZ-T-Zell-Bindung zwischen MHC II/Peptidkomplex und dem spezifischen T-Zell-Rezeptor. Biochemische und molekularbiologische Studien zeigen, daß APZ nur eine geringe Anzahl von streng definierten immunologisch wirksamen Peptiden präsentieren und zusätzlich eine große Zahl Peptide von größerer Variationsbreite (5, 88). Eine APZ, insbesondere eine DZ kann also eine sehr große Zahl von verschiedenen Peptiden präsentieren. Wahrscheinlich werden sehr wenige identische MHC-Peptidkomplexe benötigt, ungefähr 100, um ruhende T-Zellen zu stimulieren. Das Anti-CD3-Mitogenese-Modellsystem und andere Studien weisen auf die Notwendigkeit einer geringen Anzahl hin (89, 90).

Für die Antigen-spezifische Bindung zwischen DZ und T-Zellen sind einerseits akzessorische Oberflächenmoleküle von besonderer Bedeutung.

3. Für die T-Zell-Proliferation sind weiterhin noch **kostimulatorische** Signale nötig, welche von den DZ gebildet werden (95). Diese Signale sind biochemisch nicht vollständig identifiziert (96). Für das B7-1 (CD80)-Molekül, welches auf reifen DZ exprimiert wird (97, 98, 87), wurde eine kostimulatorische Funktion nachgewiesen (99, 100, 101). Dies gilt auch für das B7-2 (CD86)-Molekül (102, 103, 104, 105).

F. Wichtige Membranproteine dendritischer Zellen

<i>Dendritische Zelle</i>	<i>Gegenpart auf der T-Zelle</i>
ICAM-1 (CD54)	LFA-1(CD11a)
ICAM-3 (CD50)	LFA-1(CD11a)
B7-1 (CD80)	CD28 und CTLA-4
B7-2 (CD86)	CD28 und CTLA-4
MHC Klasse I	CD8
MHC Klasse II	CD4
CD40	CD40 Ligand

ICAM-1 und ICAM-3 agieren als Adhäsionsmoleküle, B7-1 und B7-2 haben kostimulatorische Funktion bei der T-Zellaktivierung, MHC Klasse I und MHC Klasse II sind für die MHC gekoppelte Antigen-Präsentation von Bedeutung.

CD40 ist ein integrales Membranprotein, welches auf der Oberfläche von B-Lymphozyten, reifen dendritischen Zellen, folliculären dendritischen Zellen, hämatopoietischen Vorläuferzellen, Epithelzellen und z.T. auch von Karzinomzellen exprimiert wird (168). Das CD40 Molekül bindet an seinen Liganden, welcher erst kürzlich identifiziert wurde. Er stellt ein 39 kDa Protein (gp39) dar, welches vorwiegend von aktivierten CD4 positiven T-Helferzellen exprimiert wird. Die Wechselwirkung CD40/CD40 Ligand ist einerseits für die B-Zell-Funktion und andererseits für die T-Zell-Aktivierung und Funktion von Bedeutung (169, 170). Koch et al. zeigten auf, daß die Bindung an das CD40 Molekül dendritischer Zellen zu einem Anstieg der IL-12 Produktion dieser Zellen führt (165). Interleukin-12 ist ein zentrales Zytokin in der Immunabwehr und beteiligt sich sowohl an der angeborenen als auch an der erworbenen Abwehr (108).

2. Die Rolle von Interleukin 12 in der Immunantwort

Interleukin 12 ist ein heterodimeres Zytokin. Es wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen als Antwort auf bakterielle Produkte, wie z. B. LPS (Lipopolysaccharid), auf lebende oder Hitze-inaktivierte Bakterien, wie z. B. *Staphylococcus aureus* oder auf intrazelluläre Pathogene, wie z. B. *Listeria monocytogenes* produziert. Zu den Produzenten von IL-12 gehören außerdem humane Keratinozyten, neutrophile Granulozyten, B-Zellen, Mastzellen, Langerhanszellen und andere MHC-Klasse II positive Zellen aus dem peripheren Blut, wie z. B. dendritische Zellen (106 - 111).

Interleukin 12 (IL-12) ist ein zentrales Zytokin in der Immunantwort. Es ist ein Bindeglied zwischen der angeborenen und der erworbenen Abwehr. IL-12 induziert die Produktion von Zytokinen, besonders von $\text{INF } \gamma$, durch NK-Zellen (natural killer) und T-Zellen, es agiert als Wachstumsfaktor für aktivierte NK-Zellen und T-Zellen, es steigert die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen und fördert die Entwicklung zytotoxischer T-Zellen.

IL-12 agiert an drei Punkten der Infektantwort:

- a. In der frühen Phase der Infektion induziert IL-12 die Produktion von $\text{INF } \gamma$ durch NK-Zellen und T-Zellen. $\text{INF } \gamma$ trägt zur Aktivierung phagozytischer Zellen und zur Entzündung bei.
- b. IL-12 und $\text{INF } \gamma$ favorisieren die Differenzierung von CD4 positiven Zellen in Richtung Th1 Zellen.
- c. IL-12 trägt zu einer optimalen $\text{INF } \gamma$ Produktion und Proliferation von differenzierten Th1 Zellen als Antwort auf Antigen bei.

Somit bildet das Zytokin IL-12 eine funktionelle Brücke zwischen unspezifischer angeborener Abwehr und Antigen-spezifischer erworbener Immunität (108). Eine Übersicht über die Funktion von IL-12 während der Infektantwort bietet Abb. 2.1.

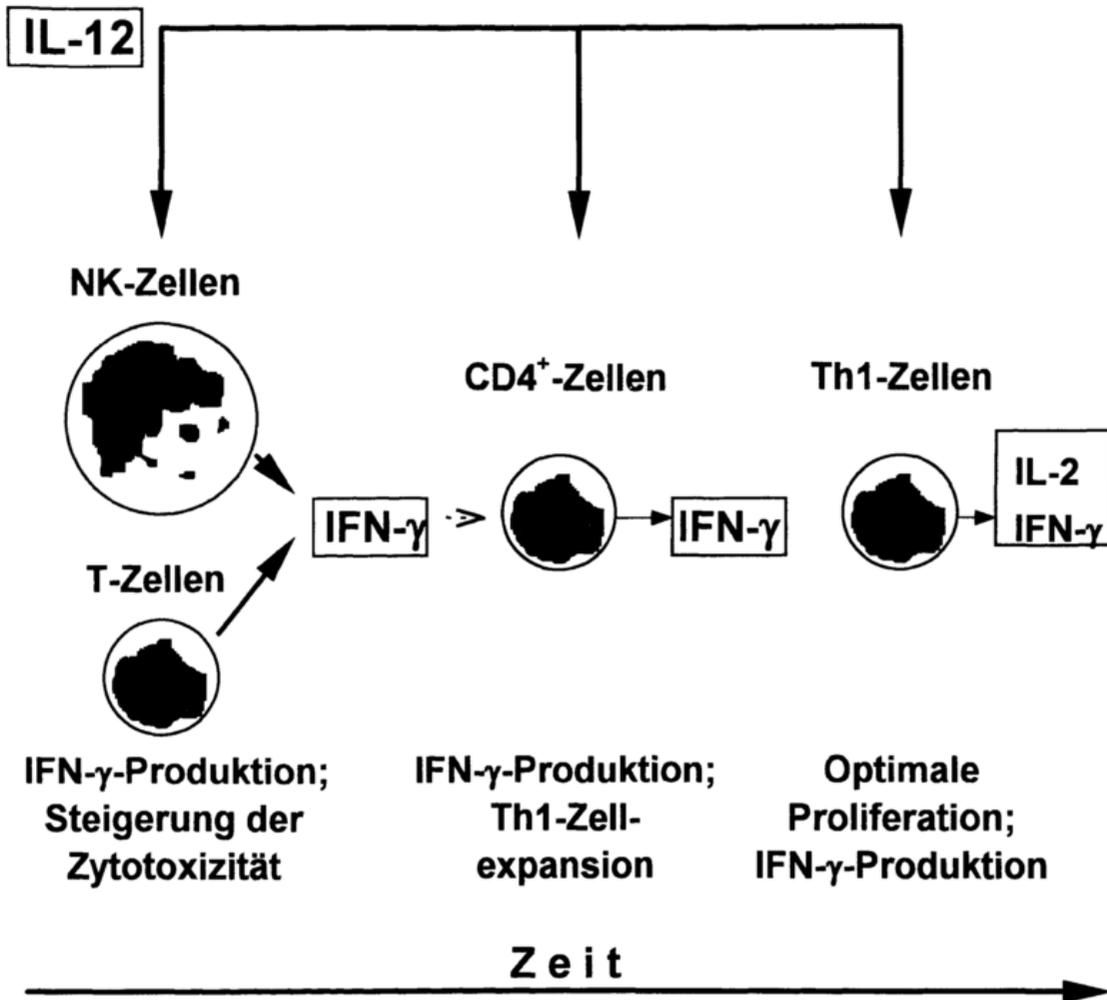


Abb.2. 1 (aus: 108)

A. Entdeckung von IL-12

Die erste Spur von IL-12 war die Vermutung, daß es Faktoren gibt, die in vivo als Antwort auf bakterielle Infektionen oder in vitro durch EBV-transformierte (Epstein Barr Virus) humane lymphoblastoide B-Zelllinien produziert werden, und die in der Lage sind, die Produktion von Interferon γ zu induzieren. Diese Faktoren sind aus-

serdem fähig, NK-Zellen (natural killer cells) zu aktivieren und als Wachstumsfaktoren für T-Zellen und NK-Zellen zu agieren.

- * Bakterien wurden beschrieben als Aktivatoren von NK-Zell-Zytotoxizität und von INF γ -Produktion. Diese Beobachtungen wurden *in vitro* (130) und *in vivo* (131, 132) gemacht.
- * Im Serum von LPS-behandelten (Lipopolysaccharid) Mäusen wurde INF γ induzierende Aktivität nachgewiesen (133)
- * Reem et al. zeigten, daß EBV-transformierte B-Zelllinien das Wachstum von T-Zellen und NK-Zellen erleichterten, und einen Faktor sezernierten, der die INF γ -Produktion induzierte (134, 135).

Durch Analyse der durch EBV-transformierte Zelllinien produzierten Faktoren wurde der NSKF (natural killer cell stimulatory factor) identifiziert mit verschiedenen Funktionen an humanen T-Zellen und NK-Zellen: Induktion von INF- γ Produktion, Steigerung der zell-mediierten **Zytotoxizität**, **mitogene Effekte** an ruhenden T-Zellen (112).

Später wurde im konditionierten Medium einer EBV-transformierten Zelllinie ein Faktor mit der Fähigkeit, die Wirkung von IL-2 zu unterstützen, gefunden und CLMF (cytotoxic lymphocyte maturation factor) genannt. Durch Reinigung und Genklonierung zeigte sich, daß NKSF und CLMF ident sind; heute ist für dieses Zytokin die Bezeichnung Interleukin 12 gebräuchlich.

B. Charakterisierung des IL-12 Moleküls

IL-12 ist ein Zytokin mit heterodimerer Struktur mit einem spezifischen Gewicht von 70 kDa (p70). Es setzt sich aus zwei glykosylierten Ketten zusammen (40 kDa und 35 kDa), die kovalent miteinander verbunden sind (112). Der Genabschnitt für die p40 Kette befindet sich auf Chromosom 5q31 - q33, jener für die p35 Kette auf Chromo-

som 3p12 - 3q13.2 (113). Die Sequenzhomologie zwischen den humanen und murinen Genabschnitten beträgt 60 %, wobei murines IL-12 sowohl an murinen als auch an humanen Lymphozyten Wirkung zeigt, humanes IL-12 jedoch nur an humanen Lymphozyten (114). Heterodimere, die aus Monomeren beider Spezies bestehen, sind an humanen Lymphozyten nur dann wirksam, wenn die p35 Kette humanen Ursprungs ist. Aus diesen Beobachtungen kann man schließen, daß die p35 Kette für die Speziespezifität verantwortlich ist.

Die p35 Kette besteht aus vier α -Helices, die antiparallel angeordnet sind. Diese Sekundärstruktur kann bei einem Großteil der Zytokine gefunden werden. Bei einem Vergleich der Aminosäuresequenz der p35 Kette mit jenen von IL-6 und GM-CSF zeigt sich, daß viele Positionen identisch konserviert wurden. Untersuchungen von Zhou et al. zeigten, daß sich das p35 Molekül sowohl an der Rezeptorbindung beteiligt als auch die Signaltransduktion bestimmt (118).

Die Aminosäuresequenz der p40 Kette ist jener des IL-6 Rezeptors, des GM-CSF Rezeptors und der α -Kette des CNTF Rezeptors (ciliary neurotrophic factor) homolog und zeigt Zeichen der Hämopoietin-Rezeptorfamilie (114, 115, 116). Die Funktion des p40 Moleküls besteht in der Rezeptorbindung während es an der Induktion des biologischen Signals nicht beteiligt ist.

Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß IL-12 aus einem primordialen Zytokin mit Ähnlichkeit zu IL-6 oder CNTF und der extrazellulären Domäne einer Kette von dessen Rezeptor entstanden ist.

Die Interaktion der beiden Ketten des IL-12 erfolgt über eine Disulfidbrücke und ist deshalb irreversibel. Es wurde beobachtet, daß eine Mischung von rekombinanten p35 und p40 Ketten die biologischen Funktionen von IL-12 mediiert. Die beiden Ketten zeigen eine Bindungsaffinität, die Konzentrationen müssen jedoch bei Verwendung der Monomere um das Dreifache höher sein als bei Verwendung von kovalent gebundenem IL-12, um vergleichbare Wirkungen zu erzielen (119).

C. Produktion von IL-12

Die Produktion von bioaktivem IL-12 setzt voraus, daß die Gene, die das p35 und das p40 Molekül kodieren, simultan exprimiert werden (120, 121). Transkripte des p35 Gens werden, wenn auch in geringem Ausmaß, in fast allen analysierten Zelltypen exprimiert (122, 123). Im Gegensatz dazu konnten keine signifikanten Mengen des p35 Proteins nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß die Sekretion von p35 Ketten nur dann in effizienter Weise stattfindet, wenn es zur Assoziation mit p40 Molekülen zur Bildung von IL-12 Heterodimeren kommt.

Die Expression der p40 Gene beschränkt sich auf jene Zelltypen, die in der Lage sind IL-12 zu produzieren (122, 123). Obwohl die Expression der beiden Gene durch Aktivierung der produzierenden Zellen reguliert wird, wird die Expression des p40 Gens interessanterweise wesentlich höher reguliert als die des p35 Gens (124, 125).

Die Hypothese, daß IL-12 von einem primordialen Zytokin/Rezeptorkomplex stammt, wird durch die Tatsache kompliziert, daß die zugehörigen transmembranen Ketten des IL-12 Rezeptors von Zelltypen (T-Zellen, NK-Zellen, hämatopoietische Stammzellen) exprimiert werden, die weder IL-12 produzieren noch IL-12 p40 exprimieren (127, 130, 131). Alle Zelltypen, die biologisch aktives IL-12 produzieren, produzieren gleichzeitig freie p40 Moleküle im Überschuß. Das Verhältnis IL-12 : freie p40 Ketten beträgt zwischen 1 : 10 und 1 : 50 (122, 129). Die physiologische Funktion der Überproduktion der freien p40 Moleküle ist noch nicht klar. Möglicherweise antagonisiert p40, im besonderen als Homodimer, die biologische Aktivität des p70 Heterodimers (119). Natürlich vorkommendes p40 Homodimer wurde jedoch noch nicht gefunden.

Im Moment ist es schwierig, die geringe Coregulation der beiden IL-12 Gene zu verstehen: Einerseits die Überproduktion von freien p40 Ketten in den IL-12 Produktionszellen, andererseits die Expression von p35 Transkripten in Zellen, die mit der IL-12 Produktion nichts zu tun haben. Möglicherweise erfüllen die beiden Ketten als

Monomere oder als Heterodimere mit anderen Polypeptiden Aufgaben, die zur Zeit noch nicht bekannt sind (108).

D. Biologische Funktionen von IL-12

a. Einfluß auf die Hämatopoiese

IL-12 agiert synergistisch mit anderen hämatopoietischen Wachstumsfaktoren. Es fördert die Proliferation und die Überlebenszeit von Stammzellen in der Kultur und führt zu einer Zunahme der Kolonien an Zahl und Größe, die von frühen multipotenten hämatopoietischen Stammzellen gebildet werden (136, 137, 138). Diese Effekte können bei Verwendung von gereinigten Stammzellen beobachtet werden. In Anwesenheit von NK-Zellen ändert sich die Wirkungsweise von IL-12. NK-Zellen produzieren als Antwort auf IL-12 TNF α und INF γ , die einen inhibitorischen Effekt auf die Hämatopoiese zeigen (139). Diese antagonistischen Effekte von IL-12 konnten im Mausmodell aufgezeigt werden. Nach wiederholten IL-12 Injektionen kommt es zu einer Reduktion der medullären Hämatopoiese mit Anämie und Neutropenie. Gleichzeitig findet man Herde extramedullärer Hämatopoiese in der Leber und in der Milz begleitet von Hepatotoxizität und Splenomegalie (139).

b. Induktion von Zytokinen

IL-12 induziert die Produktion verschiedener Zytokine von T-Zellen und NK-Zellen: IFN γ , TNF α , GM-CSF, M-CSF, IL-3, IL-8, IL-2 (112, 120, 127, 140, 142, 143, 144). IL-12 ist besonders effektiv in der Induktion von INF γ .

1. Im Vergleich zu anderen Zytokinen ist die Induktion von INF γ durch IL-12 effektiver.

2. IL-12 wirkt stark synergistisch mit anderen Stimuli in der Induktion von maximalen Mengen von INF γ .

Die Induktion von INF γ ist die wichtigste physiologisch relevante Funktion von IL-12. Viele Effekte von IL-12 werden zumindest zum Teil von INF γ mediiert (112, 127). An T-Zellen wirkt IL-12 synergistisch mit IL-2, Phorboldiester, Lectinen und T-Zellrezeptorstimuli, wie z. B. Anti-CD3-Antikörper, Alloantigene und spezifische Antigene (127, 141); an NK-Zellen wirkt IL-12 synergistisch mit IL-2, Phorboldiester, Fc-Rezeptorliganden und NK-sensitiven Zielzellen (127, 141).

Sowohl ruhende als auch aktivierte T-Zellen und NK-Zellen antworten auf IL-12 mit INF γ Produktion. Die Neutralisation von TNF α oder IL-1 β in IL-12 stimulierten Kulturen führt zu einer signifikanten Inhibition der INF γ Produktion (124). Die synergistische Wirkung von TNF α mit IL-12 in der Induktion von INF γ konnte im Maussystem verifiziert werden (145). Folglich kann man annehmen, daß TNF α und IL-1 als Cofaktoren der IL-12 mediierten INF γ Induktion wirken.

Einen weiteren Synergismus stellt die Interaktion zwischen dem CD28 Rezeptor der T-Zellen und seinem B7 Ligand dar. Das rekombinante CTLA4-Ig Molekül, das die Interaktion B7/CD28 verhindert, führt zu einer signifikanten Inhibition der INF γ Induktion durch IL-12 (125, 143).

Die Stimulation von T-Zellen während der Antigen-Präsentation erfolgt über den TCR/CD3 Komplex und wird unterstützt durch den membrangebundenen Cofaktor B7, der mit dem CD28 Rezeptor interagiert, und durch den löslichen Faktor IL-12, der von den APZ produziert wird. Maximale INF γ Produktion kann nur dann beobachtet werden, wenn diese drei Stimuli simultan auf die T-Zellen wirken (125, 143).

Sowohl im Maus- als auch im Humansystem konnte die inhibitorische Funktion von IL-10 auf die Induktion von INF γ nachgewiesen werden. Sie erfolgt *erstens* durch Suppression der IL-12 Produktion durch akzessorische Zellen, *zweitens* durch Suppression der Produktion der Cofaktoren TNF α und IL-1 und *drittens* durch Hem-

mung der Expression von B7 Molekülen auf der Oberfläche der akzessorischen Zellen (124, 125, 143).

Die synergistische Wirkung von IL-12 und IL-2 bezieht sich fast ausschließlich auf die Induktion von INF γ (142). Der molekulare Mechanismus dieses Synergismus wurde analysiert: IL-12 führt zu einer Induktion der INF γ Gentranskription, während IL-12 und IL-2 gemeinsam zu einer Erhöhung der INF γ m-RNA-Halbwertszeit führen. Die Wirkung von IL-12 erfolgt also auf transkriptionaler und posttranskriptionaler Ebene (146).

c. Steigerung der Zell-medierten Zytotoxizität

Die Behandlung von PBLs (periphere Blutlymphozyten) oder gereinigten NK-Zellen mit IL-12 verursacht innerhalb weniger Stunden eine signifikante Steigerung ihrer Zytotoxizität (112, 147). Die maximale Steigerung, die durch IL-12 gewährleistet wird, ist geringer als die durch IL-2 und vergleichbar mit jener durch INF α (112). Maximale Effekte wurden durch eine Kombination von IL-2 und IL-12 beobachtet (112, 148). Die Steigerung der Zytotoxizität zeigt sich in einem Anstieg der Granularität der NK-Zellen (149) und in einer Erleichterung der Stimulus-abhängigen Exozytose (150).

Zusätzlich befähigt IL-12 CD3 positive periphere T-Zellen zur Lyse Anti-CD3 Antikörper beschichteter, Fc-Rezeptor positiver Zielzellen (149). IL-12 fördert die Anti-CD3-induzierte Entwicklung von zytotoxischen CD8 positiven T-Zellen (150) und steigert in vitro die Bildung von CTL (zytotoxische T-Lymphozyten) (151, 152).

d. Mitogene Effekte an T-Zellen und NK-Zellen

IL-12 führt an ruhenden T-Zellen oder NK-Zellen zu einer sehr geringen oder zu keiner Proliferation. Im Gegensatz dazu kommt es an T-Zellen nach Kontakt mit PHA (Phytohämagglutinin), Alloantigenen, Phorboldiester oder IL-2 sehr wohl zu einer

Proliferationssteigerung durch IL-12 (108, 112, 141, 153). Eine direkte Induktion der Proliferation kann an aktivierten T-Zellen und NK-Zellen beobachtet werden. Der maximale Effekt beträgt jedoch nur 10 % - 50 % jenes Effekts, der durch IL-2 mediiert wird.

IL-12 induziert nur dann Proliferation von T-Zellen, wenn diese durch Antigen oder Anti-CD3-Antikörper prä- oder kostimuliert werden. Diese Tatsache weist darauf hin, daß die Expression des IL-12 Rezeptors, der für die Proliferationsinduktion benötigt wird, nur vorübergehend durch TCR/CD3 Stimulation hochreguliert wird (141).

Kostimulation durch IL-2 und IL-12 zeigt meist einen additiven Effekt. IL-12 wirkt jedoch dann inhibitorisch, wenn T-Zellen durch hohe Dosen IL-2 sehr stark in ihrer Proliferation stimuliert sind. IL-12 führt die Proliferation auf jene Ebene zurück, die es allein bewirkt hätte (141, 147). Dieser antagonistische Effekt ist abhängig vom Aktivierungsstatus der Lymphozyten:

- a) keine Inhibition bei hochaktivierten NK-Zellen
- b) keine Inhibition bei geringen IL-2-Dosen

Der inhibitorische Effekt von IL-12 wird durch neutralisierende Antikörper gegen TNF α verhindert, obwohl TNF α allein keine hemmende Funktion hat. Wahrscheinlich werden beide Zytokine für die Inhibition benötigt. IL-12 steigert die Expression des TNF-Rezeptors an NK-Zellen und sensibilisiert dadurch diese für den antiproliferativen Effekt von TNF α .

IL-4 hemmt die IL-2 induzierte Aktivierung der NK-Zelle, es beeinflusst jedoch die IL-12 induzierte Proliferation positiv (154).

IL-12 wirkt synergistisch mit der B7/CD28 Stimulation von T-Zellen. Die Proliferationsinduktion ist wesentlich deutlicher, als sie mit optimalen IL-2 Konzentrationen beobachtet wurde (143). Aktivierung über den TCR/CD3 Komplex durch Antigen, Lectine oder Antikörper ist jedoch für eine optimale Proliferation nötig (143).

Zur Erlangung eines optimalen Effekts sind wiederum drei Faktoren von Bedeutung:

- * Expression von B7 an der Oberfläche der APZ
- * Aktivierung des TCR/CD3 Komplexes
- * Sekretion von IL-12

E. IL-12 mediiert die Entwicklung von T-Helferzellen 1 (Th1 Zellen)

Naive CD4 positive T-Zellen produzieren nach Stimulation IL-2. Durch Priming entwickeln sich diese Zellen entweder in Th1 Zellen, die $\text{INF } \gamma$, $\text{TNF } \beta$ und IL-2 produzieren (172), oder in Th2 Zellen, die IL-4 und verwandte Zytokine produzieren. Zytokine (159, 160, 161, 162, 163), die entweder von den T-Zellen selbst oder von den APZ produziert werden (164), spielen in diesem Differenzierungsprozeß eine wichtige Rolle. Verschiedene Studien, sowohl im Maussystem (155, 156, 93) als auch im Humansystem (93, 157, 158, 156) zeigten die Rolle von IL-12 in dieser Differenzierung auf.

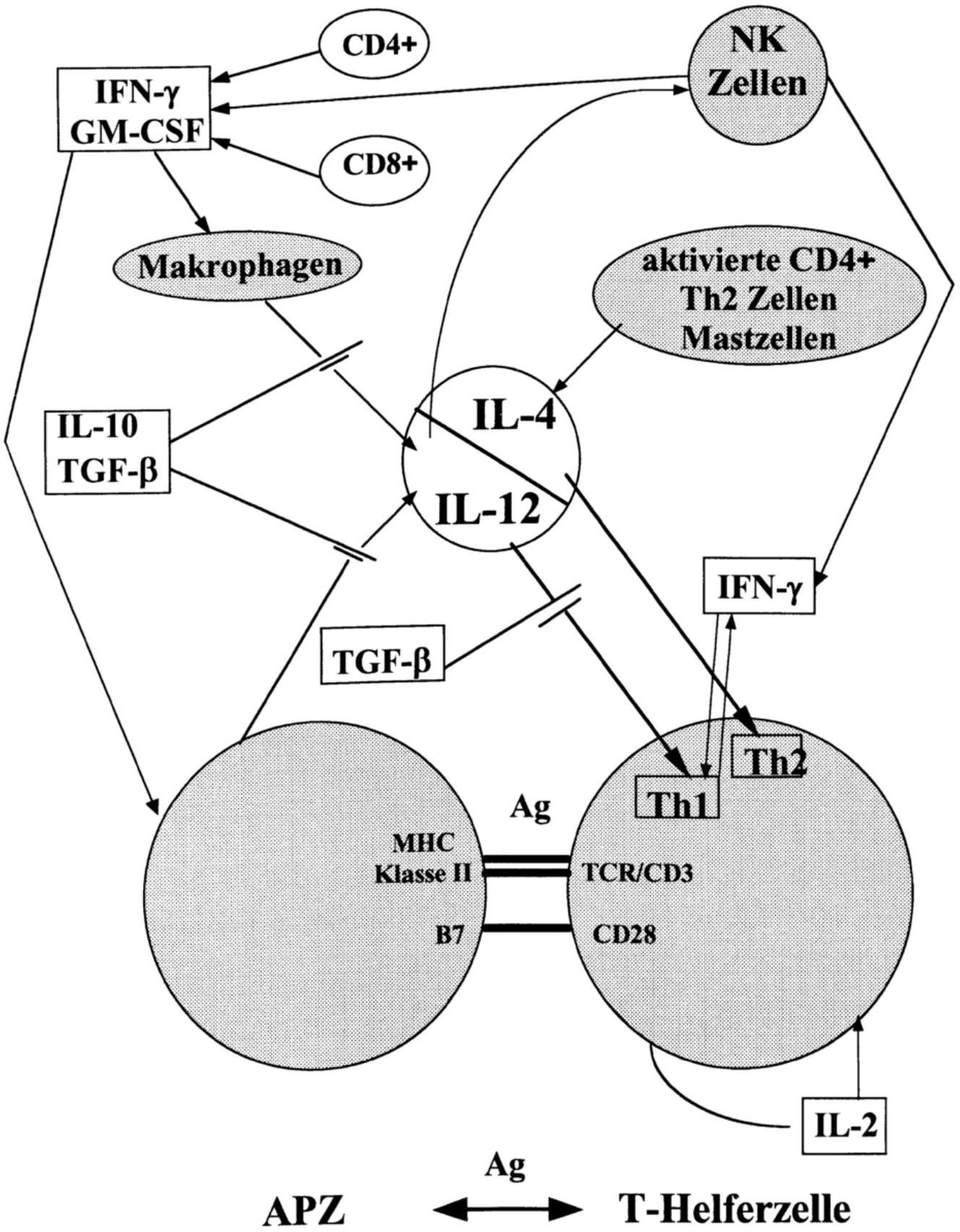
IL-12 agiert als Promoter der Entwicklung von Th1 Zellen und fungiert als Antagonist von IL-4, dem Promoter der Entwicklung von Th2 Zellen.

Die Balance zwischen IL-12 und IL-4 spielt eine zentrale Rolle in der T-Zelldifferenzierung. APZ interagieren mit T-Zellen über den TCR/CD3 Komplex, über den CD28 Rezeptor und über den löslichen Faktor IL-12. Dadurch kommt es zur Produktion von $\text{INF } \gamma$ und zur T-Zellproliferation. IL-12 wird auch von Makrophagen und anderen Zelltypen synthetisiert.

Die IL-12 Produktion wird gehemmt durch: IL10, TGF- β , IL4.

Die IL-12 Produktion wird gefördert durch: $\text{INF } \gamma$, GM-CSF.

Die nachfolgende Abbildung veranschaulicht diese Balance zwischen IL-4 und IL-12 (108).



Der IL-4 Effekt scheint dominant zu sein. IL-12 ist nicht fähig, IL-4 an der Hochregulation seiner Produktion zu hindern, IL-4 ist zumindest teilweise in der Lage, IL-12 an der Hochregulation der INF γ Produktion zu hindern (156, 157).

E. Regulation der IL-12 Produktion durch dendritische Zellen

Dendritische Zellen stellen eine IL-12 Quelle dar (93, 94, 167). Im Gegensatz zu infizierten Makrophagen erfolgt die Stimulation dendritischer Zellen zur Produktion von IL-12 wahrscheinlich durch die Interaktion mit T-Zellen während der Antigen-Präsentation (94, 172).

Einige rezente Studien zeigen die Fähigkeit dendritischer Zellen, IL-12 zu produzieren auf:

1. Anti-IL-12 blockiert die Fähigkeit von murinen dendritischen Zellen, naive T-Zellen zur Entwicklung in Richtung des Th1 Phänotyps zu veranlassen (94).
2. Durch Aufnahme von Mikropartikel-adsorbiertem Proteinantigen kommt es in murinen DC zu einer Induktion von IL-12 p40/p35 mRNA (166).
3. Kang et al. zeigten, daß auch humane Langerhanszellen IL-12 produzieren (167)
4. Heufler et al. beobachteten, daß sowohl murine als auch humane dendritische Zellen ohne exogene Stimuli und vermehrt auf konventionelle Stimuli, wie z. B. *Staphylococcus aureus* IL-12 abgeben (93). Es wurden mRNA, Protein und Bioaktivität nachgewiesen.

Dendritische Zellen werden durch bakterielle Stimuli zur Produktion von IL-12 angeregt.

5. Die neuesten Untersuchungen von Koch et al. (165) ergaben, daß murine dendritische Zellen über die Interaktion mit T-Zellen IL-12 produzieren, auch ohne daß sie einen adäquaten antigenen Stimulus erhalten. Eine besondere Rolle spielen dabei

die Bindungen an CD40 und MHC-Klasse-II-Moleküle der dendritischen Zellen. Es wurde gezeigt, daß Bindungen an CD40 oder MHC-Klasse-II-Molekülen unabhängig voneinander IL-12 Produktion auslösen.

Der CD40 mediierte Weg zeigt, daß die IL-12 Produktion in dendritischen Zellen über die Interaktion mit aktivierten, CD40 Ligand exprimierenden T-Helferzellen induziert werden kann (165).

Vergleichende Untersuchungen ergaben, daß der CD40 mediierte Weg signifikanter ist, als die Induktion via MHC-Klasse-II-Moleküle. Die Wichtigkeit der Interaktion CD40/CD40 Ligand wird durch die Tatsache bekräftigt, daß Mäuse, denen es am CD40 Liganden fehlt, nicht in der Lage sind, eine Th1 Zell-mediierte Immunantwort auszulösen (165).

3. Migrationsmuster dendritischer Zellen in der Maus

Die migratorische Kapazität dendritischer Studien wurde schon in den vorhergehenden Abschnitten behandelt. Ich möchte in diesem Teil einige Studien nennen, die sich mit dem Wanderungsverhalten exogen zugeführter dendritischer Zellen im Mausmodell beschäftigt haben.

1. Kupiec-Weglinski et al. (173) beobachteten die Migration von gereinigten dendritischen Zellen aus der Milz und von T-Zellen in syngenen und allogenen Mäusen. Die Markierung der Zellen erfolgte mit ¹¹¹Indium-Tropolone. Nach intravenöser Applikation von radioaktiv-markierten Zellen kommt es sofort zu einer Ansammlung jener in den Lungen. Die aktive Migration erfolgt in Leber und Milz, wo zwischen 3 und 24 Stunden nach Applikation ein Gleichgewicht erreicht wird. DZ sind nicht in der Lage, aus dem Blutstrom in die Peyer'schen Plaques oder in mesenteriale bzw. periphere Lymphknoten einzuwandern. Dies wurde auch bei Verwendung von splenektomierten Mäusen beobachtet. In diesem Fall wandern die "Milz-suchenden" DC in die Leber, nicht in die Lymphknoten. Dendritische Zellen sind im Gegensatz zu T-Zellen nicht fähig, vom Blutstrom über die Lymphknoten in die Lymphe zu gelangen.

Eine weitere wichtige Entdeckung von Kupiec-Weglinski et al. ist die Tatsache, daß die Migration dendritischer Zellen vom Blutstrom in die Milz T-Zell-abhängig ist. Dendritische Zellen wanderten nicht in die Milzen von T-Zell-defizienten Nacktmäusen. Die DZ, die normalerweise in die Milz einwandern, wandern in diesem Fall in die Leber. Nach Rekonstitution mit T-Zellen war die Migration wieder mit jener in euthymischen Mäusen vergleichbar.

Außerdem verfolgten Kupiec-Weglinski et al. die Wanderung von radioaktiv-markierten DZ über die afferente Lymphe nach subkutaner Injektion in die Fußpfote. Die dendritischen Zellen akkumulierten in den poplitealen Lymphknoten und

wanderten nicht weiter in die inguinalen Lymphknoten. Es konnte weiters kein Unterschied zwischen euthymischen Mäusen und T-Zell-defizienten Nacktmäusen festgestellt werden. Diese Tatsache weist darauf hin, daß die Route über die Lymphgefäße in die Lymphknoten nicht T-Zell-abhängig ist (173).

2. Austyn et al. (26) zeigten im Anschluß an die Studien von Kupiec-Weglinski die Lokalisation von exogen applizierten dendritischen Zellen innerhalb der Milz. Die Zellen wurden zu diesem Zweck mit Fluorochrom markiert und intravenös appliziert. Die Milzen wurden 3 bzw. 24 Stunden nach dem Eingriff entfernt. Die dendritischen Zellen wurden innerhalb verschiedener Areale, die durch murine Antikörper und FITC-Anti-Immunglobulinen definiert wurden, visualisiert. Drei Stunden nach Applikation befand sich der Großteil der DZ in der roten Pulpa; nach 24 Stunden konnte die Mehrzahl der DZ in den T-Zell-abhängigen Arealen der weißen Pulpa nachgewiesen werden; sie werden wahrscheinlich zu interdigitierenden Zellen.

Austyn et al. entwickelten außerdem einen Assay mit Hilfe von Gefrierschnitten, um die Interaktion von DZ mit verschiedenen lymphoiden Elementen zu erforschen. Bei Inkubation von DZ auf Gefrierschnitten der Milz kommt es bei 37°C, nicht jedoch bei 4°C, zu einer spezifischen Bindung innerhalb der Marginalzone. Eine Bindung innerhalb der T-Areale konnte nicht beobachtet werden. Makrophagen zeigten nur innerhalb der roten Pulpa spezifische Bindungen, T-Zellen banden nicht.

DZ zeigten keine spezifischen Bindungen nach Inkubation auf Gefrierschnitten mesenterialer Lymphknoten, wohingegen T-Zellen bei 4°C endotheliale Venolen markierten. Es besteht die Vermutung, daß T-Zellen das vaskuläre Endothel in manchen Arealen verändern können, um so dendritischen Zellen den Eintritt vom Blutstrom in die Milz zu ermöglichen.

3. Die Studien von Moll et al. zeigten im Mausmodell, daß Langerhanszellen in der Leishmaniasis eine zentrale Rolle spielen. LZ internalisieren *Leishmania major* in der Haut und transportieren sie über die afferenten Lymphbahnen zu den regiona-

len Lymphknoten zur Initiation der spezifischen T-Zell-Immunantwort. Im Gegensatz dazu konnte diese Wanderung bei Verwendung von *L. major*-infizierten Makrophagen nicht beobachtet werden. Zur Visualisierung dieser Entdeckung verwendete die Arbeitsgruppe um Moll den fluoreszierenden, lipophilen Farbstoff PKH-26 zur Markierung der dendritischen Zellen. Die intrazellulären Parasiten wurden durch Inkubation der nodalen Zellen mit Acridinorange und Ethidiumbromid sichtbar gemacht (174).

4. Fragestellung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit zwei Teilaspekten der Funktion der dendritischen Zellen:

A: die adjuvante Funktion

B: die migratorische Funktion

Ein besseres Verständnis dieser Aspekte ist besonders im Hinblick auf einen künftigen Einsatz von dendritischen Zellen in der Klinik (z. B. Tumortherapie) entscheidend wichtig.

A. Die adjuvante Funktion dendritischer Zellen

Die adjuvante Funktion dendritischer Zellen ist deren Fähigkeit, das prozessierte und an den MHC-Komplex gekoppelte Antigen spezifischen T-Zellen zu präsentieren und diese dadurch zu stimulieren.

IL-12 ist ein zentrales Zytokin, sowohl in der angeborenen als auch in der erworbenen Immunität. Es ist für die T-Zell-Stimulation, besonders für die Entwicklung von T-Helferzellen Typ 1 von Bedeutung

Die im folgenden aufgeführten Fragen, die in dieser Arbeit gestellt wurden, bauen auf rezente Studien auf, die zu einem guten Teil in unserem Labor erhoben wurden.

- # Im Maussystem fanden Koch et al. aus unserem Labor (165) eine Hochregulation von IL-12 auf die Stimulierung des CD40 Moleküls. Sind diese Beobachtungen auch im Humansystem zutreffend?
- # Kommt es auch im Humansystem zu einer Steigerung der IL-12 Produktion durch Stimulierung des MHC-Klasse-II Moleküls, wie Koch et al. (165) dies im Mausystem beschrieben haben?
- # Welche Auswirkungen hat der T-Zellkontakt auf die IL-12 Produktion dendritischer Zellen?

Im Mausystem wurde die IL-12 Produktion als Antwort auf T-Zellkontakt von Heufler et al. beschrieben (93)

- # Heufler et al. (93) beobachteten, daß DZ spontan und -vermehrt- auf bakterielle Stimuli IL-12 bilden. Welche Abhängigkeiten zeigt diese Stimulierbarkeit?
- # Ist diese Fähigkeit differentiell ausgebildet in Abhängigkeit vom Reifegrad?

B. Die migratorische Funktion dendritischer Zellen

Austyn (26) und Kupiec-Weglinski (173) beschrieben in ihren Arbeiten die Migrationsmuster intravenös oder subkutan applizierter muriner dendritischer Zellen in der Maus.

Über die Migrationsmuster von gezüchteten humanen dendritischen Zellen, also derjenigen dendritischen Zellen, deren klinischer Einsatz erwogen wird, ist praktisch nichts bekannt.

- # Welche Wanderungseigenschaften zeigen humane dendritische Zellen im Mausystem, also in einem xenogenen System?
- # Ist dieses Tiermodell zum Studium der Migration humaner dendritischer Zellen geeignet?

II. MATERIAL UND METHODIK

Ich möchte dieses Kapitel entsprechend meiner Fragestellung in drei Teilen erörtern:

1. Präparation von dendritischen Zellen aus humanem Blut
2. Einfluß von verschiedenen Stimulantien auf die Hochregulation der Interleukin-12-Produktion durch dendritische Zellen.
3. Nachweis der Migration von humanen dendritischen Zellen in der Maus.

1. Präparation von dendritischen Zellen aus humanem Blut

A. Material

Laborutensilien

- * sterile Pipetten (25 ml, 10 ml, 5 ml) (Gold Well, Becton Dickinson, NJ, USA)
- * sterile Pipetten (2 ml, 1 ml) (Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA)
- * Petri-Schalen (100 mm x 15 mm) (Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA)
- * Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (15 ml) (Costar, Cambridge, MA, USA)
- * Polystyrol-Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml) (Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA)
- * Gewebekulturplatten (6-well, 12-well, 96-well) (Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA)
- * Gewebekulturplatten (24-well, 48-well) (Costar, Cambridge, MA, USA)
- * Pasteurpipetten aus Glas, Länge 230 mm (Brand, Best. Nr.747720)
- * sterile Werkbank (Danlaf, Dänemark)
- * Brutschrank für Zell- und Gewebekultur (Heraeus Cytoperm)
- * Omnifuge (Heraeus Sepatech)
- * Megafuge (Heraeus Sepatech)
- * Hämocytometer (Reichert, Brightline, 0,1 mm Tiefe, NJ, USA)
- * Phasenkontrastmikroskop (Nikon)
- * Lichtmikroskop (Reichert Biovar)
- * Wasserbad (julabo SW-20C)
- * "sample mixer" (Dynal) Spezialgerät zum schonenden Mischen von Zellen und Dynabeads während der Inkubationszeit.

Kulturmedium

In allen Experimenten wurde für die Zellkultur das Kulturmedium RPMI 1640 verwendet (Seromed Biochrom, Berlin). Diesem Medium wurde 10 % hitzeinaktiviertes (56 °C, 30 min) fetales Kälberserum (FCS, Gibco, Paisley, Scotland), 50 µM 2-Mercaptoethanol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 20 µg/ml Gentamicin (JRH Bioscience) sowie 200mM L-Glutamin (Sebak, Stuben, A) zugesetzt. Dieses Nährmedium wird im folgenden mit der Abkürzung "R10" bezeichnet.

PBS (Phosphate buffered saline)

Dulbeccos PBS (Biological Industries, Kibbutz Haemek Israel, Nr. 02-023-1A, ohne Ca²⁺, Mg²⁺, Israel).

PBS wurde außerdem mit Zusätzen verwendet:

+ PBS-Heparin

500 ml PBS + 500 µl Heparin (Heparin "Novo", 5000 IE/ml, Novo Nordisk A/S, 2880 Bagsvaerd, Dänemark)

Heparin hemmt die Blutgerinnung in vitro und in vivo. Hauptwirkung ist die Hemmung des aktivierten Faktors X und die Thrombinhemmung.

+ PBS-EDTA

500ml PBS + 1ml 0,5 M EDTA

+ PBS-BSA

100ml PBS + 3,5 ml BSA (Rinderserumalbumin von Biomex, Cohn Fraction V, pH 5,2, Nr. H-94412, Mannheim, D)

Humanes Blut

Zur Gewinnung humaner PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) verwendete ich Zellkonzentrate, die von der Blutbank der Innsbrucker Klinik zur Verfügung gestellt wurden.

Lymphoprep

Lymphoprep ist eine sterile und Pyrogen-freie Lösung zur Isolation von Populationen reiner PBMCs. Sie beinhaltet:

Sodium Metrizoate 9,6 %

Polysaccharide 5,6 %

Physikalisch-chemische Charakteristika:

Dichte: $1,077 \pm 0.001$ g/ml

Osmolalität: 280 ± 15 mOsm

Prinzip:

Die bekannteste Technik zur Separation von Leukozyten ist die Mischung des Blutes mit einer Substanz, die zu einer Aggregation der Erythrozyten führt, und somit deren Sedimentationsrate erhöht. Die Sedimentation der Leukozyten wird nur geringfügig beeinträchtigt. Sie können vom oberen Teil des Röhrchens abgenommen werden, wenn sich die Erythrozyten nach Zentrifugation am Boden gesammelt haben.

(Lymphoprep, Nycomed Pharmas AS, 5012 Majorstua, Oslo, Norway)

Dynabeads

Dynabeads sind uniforme, magnetisierbare Polystyrenkörperchen, die mit primären (A, B) bzw. sekundären (C) monoklonalen Antikörpern beschichtet sind. Die murinen IgM Antikörper bzw. die Schaf-Anti-Maus-IgG sind direkt an die Dynabead-Oberfläche adsorbiert. Ich verwendete in meinen Experimenten drei Arten von Dynabeads:

- A. Dynabeads M-450 Pan-B (CD19), die spezifisch für das CD19 Membranantigen der B-Zellen sind.
- B. Dynabeads M-450 Pan-T (CD2), die spezifisch für das CD2 Membranantigen sind, das auf T-Zellen und NK-Zellen (natural killer) exprimiert wird.
- C. Dynabeads M-450 Schaf-Anti-Maus IgG; Schaf-Anti-Maus-IgG sind kovalent an die Oberfläche der Dynabeads gebunden. Diese sekundären Antikörper binden sowohl schwere als auch leichte Ketten von Maus-IgG und leichte Ketten von Maus-IgM.

Dynabeads werden zur immunomagnetischen Zellisolation verwendet. Dies ist eine schnelle und verlässliche Methode zur positiven oder negativen Selektion von Zellen. Während einer kurzen Inkubationszeit kommt es zur Bindung der Dynabeads an die jeweiligen Zielzellen, die dann durch Anwendung eines Magneten isoliert werden. Die Dynabeads beeinträchtigen die Viabilität der Zellen nicht.

(Dynabeads, Deutsche Dynal GmbH, Hamburg, D)

GM-CSF

GM-CSF (granulocyte/monocyte colony stimulating factor) ist für die Reifung dendritischer Zellen in vitro von besonderer Bedeutung. Er wurde in einer Konzentration von 800 U/ml R10 verwendet (spezifische Aktivität von $1,1 \cdot 10^7$ U/mg) (Leukomax "Sandoz", Sandoz GmbH, Wien, A)

IL-4

IL-4 ist ein Zytokin, das neben vielen anderen Funktionen die Fähigkeit hat, die Entwicklung von Monozyten/Makrophagen in der Kultur zu inhibieren (178). In der Kombination mit GM-CSF kommt es zur Ausbildung von großen Aggregaten proliferierender dendritischer Zellen (179). IL-4 wurde in einer Konzentration von 500 U/ml R10, (spez. Aktivität $5 \cdot 10^7$ U/mg), (Immunex) bzw. 500 ng/ml (spez. Aktivität nicht bekannt) (Sandoz) verwendet.

(* Rekombinantes IL-4, Immunex Corporation, Seattle, WA)

* Rekombinantes humanes IL-4, Sandoz GmbH, Wien, A; dieses Zytokin wurde uns freundlicherweise von Dr. Ekke Wiehl (Forschungsinstitut Sandoz, Wien) zur Verfügung gestellt)

Humanes Gammaglobulin

Humanes IgG wurde zur Beschichtung von Petri-Schalen verwendet. IgG am Boden dieser Schalen führt zur Anheftung und Stimulierung von Monozyten/Makrophagen.

Verwendete Konzentration: 0,01 g/ml PBS, 10 ml/Schale

Inkubationszeit: 1 h bei Raumtemperatur

(IgG, Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA)

Antikörper

CD2-Antikörper: Diese murinen IgG2a Antikörper werden im Rahmen der indirekten Depletion verwendet (siehe unten). Sie werden von Zellen des Klonen OKT 11 produziert. Zellen dieses Klonen werden in R10 kultiviert und geben diese Antikörper in das Medium ab. Die Überstände (Supernatanten) werden unverdünnt als Antikörperquelle verwendet. (Herkunft der Hybridomzellen: American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA).

CD20: Auch diese murinen IgG1-Antikörper werden im Verlauf der indirekten Depletion benötigt. Die Verdünnung beträgt 1 : 100. (Klon MEM-97, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Vaclav Horejsi, Institut für Immunologie, Prag)

Monozyten-konditioniertes Medium (MCM)

Herstellung:

1. Beschichtung von Petri-Schalen mit IgG; 1 h Inkubation bei Raumtemperatur;
2. 3-maliges Waschen mit PBS;

3. Zugabe von 50 Millionen PBMC (peripher blood mononuclear cells) (Gewinnung siehe unten) in 10 ml R10/Petri-Schale;
4. Inkubation für 1 h bei 37°C. In dieser Zeit binden Monozyten/Makrophagen an das IgG am Schalenboden;
5. Nach Inkubation 3-maliges Waschen mit PBS. Dadurch wird die nicht-adhärenente Fraktion der PBMCs entfernt; der größte Teil des Bodens ist jetzt mit adhärenenten, ausgebreiteten Monozyten/Makrophagen ("Spiegeleier-förmig.") bedeckt.
6. Zugabe von 10 ml R10/Petri-Schale. Inkubation für 24 h bei 37°C. In dieser Zeit geben die adhärenenten Zellen Faktoren in das Medium ab, die für die Ausreifung dendritischer Zellen in vitro von besonderer Bedeutung sind;
7. Abnahme der Überstände, Abzentrifugation (1200 U, 8min, 4 °C), um restliche Zellen zu entfernen;
8. Verwendung von MCM siehe unten;

B. Methoden

1. Gewinnung der PBMCs

1. Vermengung von auf 37 °C erwärmtem PBS-Heparin mit humanem Blut (Zellkonzentrat) im Verhältnis 2 : 1 (Verwendung von 50ml-Polystyrol-Röhrchen: 20 ml PBS-Heparin, 10 ml Blut).
2. Unterschichtung mit jeweils 10 ml Lymphoprep.
3. Zentrifugation: 20 min, 20 °C, 1000 Umdrehungen/min (U)
4. Abnahme von ca. 20 ml Serum. Dadurch wird der Großteil der Thrombozyten entfernt.
5. Zentrifugation: 30 min, 20°C, 1500 U
6. Abnahme der PBMCs (peripheral blood mononuclear cells), die sich in der Mitte des Röhrchens als "buffy coat" gesammelt haben.
7. 3-maliges Waschen mit PBS-EDTA (1000 U, 4 °C, 8 min).
8. Ermittlung der Zellzahl und der Viabilität mit Hilfe des Hämozytometers und Trypanblau als Vitalfärbung.

2. Depletion der Lymphozyten

Zur Entfernung der T- und B-Lymphozyten stehen zwei Methoden zur Verfügung:

- * Immunomagnetische Depletion (direkt/indirekt) mit Hilfe von Dynabeads
- * Depletion durch Ausnützung der Adhärenzeigenschaften von Monozyten/Makrophagen, Verwerfen der nicht-adhärenen Fraktion

2a. Immunomagnetische direkte Depletion der Lymphozyten

1. Dynabeads M-450 Pan B (CD19) und Dynabeads M-450 Pan T (CD2) werden in einem Verhältnis von jeweils 1ml beads auf 400 Millionen PBMCs verwendet. Das Verhältnis Beads : Lymphozyten beträgt somit 1 : 1. Die beads werden mit PBS-BSA aus ihrem Lösungsmedium herausgewaschen. Dazu verwendet man einen Magneten, der die Magnetkörperchen an den Röhrchenrand zieht und so von der Flüssigkeit trennt.
2. Vermischung der PBMCs mit den Dynabeads. Es werden 15 ml-Polypropylen-Röhrchen verwendet, die jeweils 3 ml PBS-BSA, 150 Millionen PBMCs und die entsprechende Menge beads enthalten sollen.
3. 20 Minuten Inkubationszeit im "sample mixer" bei 4 °C.
4. Durch Verwendung eines Magneten können die Dynabeads mit den an sie gebundenen B- und T-Zellen am Röhrchenrand fixiert werden. Die Flüssigkeit mit den übrigen Zellen wird vorsichtig abgenommen.
5. 3-maliges Waschen mit PBS-BSA; Ermittlung der Zellzahl.
6. Wiederholung der Schritte 2 - 5, um die Zahl der verbleibenden B- und T-Zellen weiter zu verringern.

2b. Immunomagnetische indirekte Depletion der Lymphozyten

1. CD20-Antikörper wird mit 200 µl PBS 1 : 100 verdünnt und mit 2 ml OKT 11-Supernatans vermischt.
2. PBMCs werden in diesem Gemisch resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die Antikörper binden spezifisch an die zugehörigen Oberflächenmembranproteine der T- und B-Zellen.
3. 3-maliges Waschen mit PBS-EDTA (1000 U, 4 °C, 8 min), um nicht-gebundene Antikörper zu entfernen.

4. Dynabeads M-450 Schaf-Anti-Maus IgG werden in einem Verhältnis von 1 ml auf 200 Millionen Zellen verwendet, das entspricht einem Verhältnis von je zwei beads/Lymphozyt. Diese sekundären Antikörper binden an die Primärantikörper an der Oberfläche der T- und B-Zellen und machen sie dadurch zur immunomagnetischen Isolation bereit.
5. Weiteres Procedere siehe direkte Depletion Schritte 3 - 6.

2c. Depletion der Lymphozyten aufgrund ihrer Unfähigkeit zu adhären

1. Petri-Schalen werden mit humanem Gammaglobulin beschichtet und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.
2. 3-maliges Waschen mit PBS
3. Zugabe von 50 Millionen PBMCs in 10 ml R10; dieser Ansatz wird 1 h bei 37 °C inkubiert.
4. Die Monozyten/Makrophagen binden an das humane Gammaglobulin und werden dadurch zur adhärenen Fraktion. B- und T-Lymphozyten sowie auch andere Zellen bleiben im Überstand und werden gemeinsam mit dem Medium abgesaugt.
5. 3-maliges Waschen mit PBS, um die nicht-adhärenente Fraktion vollständig zu entfernen.
6. Zugabe von 10 ml R10/Schale; Inkubation bei 37 °C für 24 h
7. Abnahme des Überstandes, Verwendung als MCM.
Zugabe von 10ml R10/Schale, wobei ab jetzt dem Medium 500 U/ml IL-4 und 800 U/ml GM-CSF zugesetzt werden (Tag 0). Am Tag 2 werden 5ml R10/IL-4/GM-CSF/Schale ergänzt. Durch die Zytokinsubstitution kommt es zur Ablösung der adhärenen Zellen.
8. Am Tag 3 werden die Zellsuspensionen abgenommen und abzentrifugiert (1000 U, 4 °C, 8 Minuten). Die Zellen werden in 6-well-Platten weiterkultiviert (1 Million Zellen, 4 ml R10, 500 U/ml IL-4 und 800 U/ml GM-CSF kommen in eine Vertiefung).

3. Kultur der lymphozyten-freien PBMCs

3a. Vorbereitungskultur oder "priming culture"

Die von B- und T-Lymphozyten gereinigten PBMCs werden in R10, dem GM-CSF und IL-4 zugesetzt wird, im Brutschrank bei 37 °C inkubiert (Verwendung von 6-well-Platten: 4 ml Medium, 500 U/ml IL-4, 800 U/ml GM-CSF und 2 Millionen

Zellen kommen in eine Vertiefung) (Tag 0). An geraden Tagen werden 1,5 ml Medium/well abgenommen und 2 ml R10, 1000 U/ml IL-4 und 1600 U/ml GM-CSF substituiert. Dieser Vorgangsweise liegt die (experimentell nicht überprüfte) Annahme zugrunde, daß die Zytokine während der jeweils zweitägigen Kulturperiode völlig verbraucht wurden, und daß 0,5 ml Medium verdunstet sind. Durch Zugabe von 2 ml frischem Medium mit der doppelten Zytokinkonzentration werden somit die Ausgangskonzentrationen und das Ausgangsvolumen wieder hergestellt.

3b. Reifungskultur oder "differentiation culture"

Am Tag 7 werden 1,5 ml Medium/well abgenommen. Die Zellsuspensionen werden in neue 6-well-Platten transferiert und mit 25 % MCM substituiert. Außerdem wird in jede Vertiefung 1 ml R10/1000 U/ml IL-4/1600 U/ml GM-CSF zugegeben.

Morphologie beobachten.

Am Tag 10 werden die Zellen gesammelt, gezählt, phänotypisch und morphologisch analysiert und anschließend für die eigentlichen Experimente verwendet.

4. Zellfärbung für die Durchflußzytometrie

Material

- * 96-well-Platte mit Spitzboden (Costar, Cambridge, MO, USA)
- * PBS-BSA
- * Primärantikörper:

Anti-CD83-Antikörper: CD 83 ist ein Membranprotein, das nur auf reifen dendritischen Zellen exprimiert wird (177).

Der Nachweis von CD83 mit Hilfe des spezifischen murinen IgG2b-Antikörpers eignet sich deshalb zur Differenzierung reifer von unreifen Zellen. Die Anwendung erfolgt in der Verdünnung 1 : 1000.

(Klon HB15, Dr. Thomas Tedder, Department of Immunology, School of Medicine, Duke University, Durham, NC, USA)

Isotyp: Als Negativkontrolle wird ein muriner IgG2b-Antikörper mit Spezifität für *Aspergillus niger* Glukose-Oxidase verwendet. (DAKO A/S, Glostrup, Dänemark)

- * Sekundärantikörper:
Biotinylierter Anti-Maus-Ig-Antikörper: Verdünnung 1 : 100 (code RPN 1001, Amersham, England)
- * Tertiärreagenz:
Streptavidin konjugiert an Fluorescein-Isothiocyanat (FITC): Verdünnung 1 : 100 (code RPN 1232, Amersham, England)
- * Megafuge (Heraeus, Sepatech)

Methode

1. Es werden jeweils zwischen 100 000 und 1 Million Zellen und 100 µl PBS-BSA in drei Vertiefungen der 96-well-Platte pipettiert.
2. Zentrifugation (1000 U, 4 °C, 4 min)
3. Zugabe der Primärantikörper in den vorgeschriebenen Verdünnungen (Verdünnung in jeweils 50-100 µl PBS-BSA). Der dritte Ansatz erfolgt immer nur mit 100 µl PBS-BSA.
4. 30 min Inkubation auf Eis
5. 3-maliges Waschen mit PBS-BSA (1000 U, 4 °C, 4 min)
6. Zugabe von Sekundärantikörper in 100 µl PBS-BSA
7. 30 min Inkubation auf Eis
8. 3-maliges Waschen mit PBS-BSA (1000 U, 4 °C, 4 min)
9. Zugabe des Tertiärreagenzes in 100 µl PBS-BSA
10. 30 min Inkubation auf Eis. Ab diesem Schritt müssen die Zellen vor Licht geschützt werden.
11. 3-maliges Waschen mit PBS (BSA könnte im Durchflußzytometer Verstopfungen verursachen).
12. Jeder Ansatz wird in 200 µl PBS resuspendiert.
13. Auswertung;

2. Stimulation von dendritischen Zellen zur Produktion von IL-12

A. Material

Ich verwendete zur Untersuchung der Stimulierbarkeit dendritischer Zellen sowohl reife (Kultivierung bis Tag 10, Zugabe von MCM) als auch unreife Zellen (Kultivierung bis Tag 7).

Verwendete Stimulantien

- * **SACS:** (fixierte Staphylokokken vom Stamm *Staphylococcus aureus*, COWAN I) (Pansorbin cells, Calbiochem-Novabiochem Corporation, La Jolla, CA). SACS wird als konventioneller Stimulus für IL-12-Produktion verwendet.
- * **Lipopolysaccharid:** Lipopolysaccharide werden aus der Zellwand gram-negativer Bakterien isoliert. Sie werden hauptsächlich in der experimentellen Immunologie zur Aktivierung von immunkompetenten Zellen verwendet (Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA). Verwendete Konzentration: 100 ng/ml
- * **G 28.5:** Diese murinen monoklonalen IgG1-Antikörper binden spezifisch an CD40-Oberflächenmembranproteine dendritischer Zellen. Die zur Verfügung stehende Konzentration des gereinigten Immunglobulins beträgt 500 mg/ml. (von: Dr. E. Clark, Seattle, WA, USA).
- * **Anti-CD40-Antikörper (MABO 89):** Dieser murine IgG1-Antikörper bindet spezifisch an das CD40-Molekül dendritischer Zellen. Die zur Verfügung stehende Konzentration beträgt 200 mg/ml. (Immunotech, Marseille, France).
- * **Anti-MHC-Klasse-II-Antikörper:** Murine IgG2a-Antikörper gegen MHC-Klasse-II-Moleküle werden sowohl vom Klon 9. 3F10/HB180 (Anti-HLA-DR und DQ) als auch vom Klon L243/HB 55 (Anti-HLA-DR) produziert. Die Überstände werden unverdünnt verwendet. (Herkunft der Hybridomzellen: American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA).
- * **Anti-MHC-Klasse-I-Antikörper:** Diese IgG2a-Antikörper werden vom Klon W6/32 (HB 95) gewonnen. Die Überstände werden wiederum unverdünnt verwendet. (Herkunft des Hybridoms: American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA)
- * **Kontrollantikörper:** Als Negativkontrolle wurden vom Klon OKT 6 produzierte IgG1-Antikörper gegen humane Thymozyten und Lymphozyten verwendet (anti-CD1a). Dieses Molekül ist auch auf den untersuchten humanen dendritischen Zellen exprimiert. Die Verwendung des Supernatanten erfolgte unverdünnt. (Herkunft des Hybridoms: American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA).
- * **Concanavalin A:** Dieses Lectin hat die Eigenschaft, durch polyvalente Bindungen zu Zellagglutination zu führen. Dadurch können beispielsweise dendritische Zellen und T-Zellen unspezifisch aneinandergelagert werden. Dabei kommt es zu einer starken, polyklonalen Aktivierung der T-Zellen. Es stellte sich die Frage, ob dendritische Zellen auf diese Weise zur IL-12-Produktion

stimuliert werden können. Es wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml Medium verwendet. (Grad III, hoch gereinigt, Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA).

- * **Phytohämagglutinin:** Dieses Reagenz ist ebenfalls ein Lektin mit dem Concanavalin A vergleichbaren Eigenschaften. Es wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml verwendet (Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA).

B. Methodik

Zugabe von Stimulantien

1. Abnahme der Zellsuspensionen, Abzentrifugation (1000 U, 4 °C, 8 min); Ermittlung der Zellzahl
2. Verwendung von 24-well-Platten; in jede Vertiefung kommen 1 Million Zellen in 1 ml Medium. Das Ausgangsmedium ist R10.
3. Stimulierung dendritischer Zellen durch Zugabe verschiedener Stimulantien:
 - * SACS: Verwendung 1 : 1000 und 1 : 10000
 - * G28. 5: Verwendung 10 mg/ml, 5 mg/ml, 1 mg/ml
 - * Anti-CD40 (MAB89): Verwendung: 20 mg/ml, 6 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml, 0,4 mg/ml
 - * Concanavalin A: Verwendung: 1 µg/ml
 - * Phytohämagglutinin: Verwendung: 1 µg/ml
 - * Lipopolysaccharid: Verwendung: 100 ng/ml
 - * Die Supernatanten (OKT 6, HB 95, HB 55, 9. 3F10): Verwendung unverdünnt im Verhältnis 1 : 3
4. Nach Zugabe der Stimulantien werden die Zellsuspensionen 48 h bzw. 72 h bei 37 °C inkubiert. Bei positiver Stimulation kommt es zur Produktion von IL-12 durch die dendritischen Zellen. Die Zellsuspensionen werden nach Inkubation abgenommen und abzentrifugiert (1000 U, 4 °C, 8 min). Die Überstände werden mit Hilfe des ELISA auf die Anwesenheit von IL-12 untersucht.

Panning

Eine weitere Möglichkeit, dendritische Zellen mit stimulierenden Antikörpern in Kontakt zu bringen, ist die "Panning-Technik" (177). Da die Antikörper bei dieser Technik immobilisiert sind, sollte es zu einer stärkeren Vernetzung ("crosslinking") der Moleküle auf der Zelloberfläche kommen.

1. Bakteriologische Petri-Schalen (35x10) werden mit 40 µg/ml Antikörper in PBS beschichtet. Ich verwendete für diese Experimente sowohl den Anti-CD40-Antikörper G28. 5 als auch den Anti-CD40-Antikörper MABO 89. Um eine gute Abdeckung des Schalenbodens zu erreichen verwendet man 1,5 ml/Schale.
2. 1 h Inkubation bei Raumtemperatur
3. 5-maliges Waschen mit PBS
4. Zugabe von 2 Millionen dendritischen Zellen in 2 ml R10.
5. Inkubation bei 37 °C für 48 h bzw. 72 h.
6. Abnahme und Auswertung der Überstände

C. Nachweis des durch dendritische Zellen sezernierten IL-12 durch ELISA (Enzyme linked immuno sorbent assay)

Prinzip

Diese Methode bedient sich einer quantitativen Enzym-Immuno-Sandwich-Technik. Eine Mikrotiterplatte ist beschichtet mit einem monoklonalen Antikörper, der spezifisch für IL-12 ist. Der konkrete Antikörper erkennt nur das bioaktive IL-12 p70 Heterodimer, nicht aber die oft im Überschuß vorkommende p40 Kette. Standards und Proben werden in die Vertiefungen der Platte pipettiert; bei Vorhandensein von IL-12 kommt es zur Bindung an die immobilisierten Antikörper. Durch Abwaschen werden alle ungebundenen Substanzen entfernt. Danach wird ein zweiter für IL-12 spezifischer polyklonaler Antikörper zugegeben, an den ein Enzym gekoppelt ist. Nach dem Abwaschen der ungebundenen Substanzen wird eine Substratlösung zugegeben. Die Entwicklung der Farbreaktion ist proportional der IL-12-Bindung an den monoklonalen Antikörper.

Material:

- * IL-12-Mikrotiterplatte (890212): 96-well-Polystyrene-Mikrotiterplatte beschichtet mit murinen monoklonalen Anti-IL-12-Antikörpern
- * IL-12-Konjugat (890213): Polyklonaler Anti-IL-12-Antikörper gekoppelt an Peroxidase
- * IL-12-Standard (890214): 2,5 ng rekombinantes IL-12 in einer gepufferten Lösung auf Proteinbasis
- * Verdünnungsmittel RD1F (895041): Gepufferte Lösung auf Proteinbasis

- * Verdünnungsmittel RD5C zur Kalibrierung (895046): Gepufferte Lösung auf Proteinbasis (5-fach Konzentrat)
- * Waschlösung (895003): Gepufferte Lösung (25-fach Konzentrat)
- * Farbreagenz A (895000): Hydrogenperoxid
- * Farbreagenz B (895001): Tetramethylbenzidin (Chromogen)
- * Stopplösung (895032): 2N schwefelige Säure
- * Abdeckung für die Platte: 4 Klebestreifen

(Alle Reagenzien stammen von: R&D Systems, Minneapolis, USA). Eine vergleichende Testung dieses QuantikineTM wurde kürzlich beschrieben (181).

ansonsten

- Mikrotiterplatte zur Absorptionsmessung bei 450nm
- Pipetten (50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)
- Destilliertes Wasser

Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien werden bei Raumtemperatur verwendet.

- * Waschlösung: 20 ml Konzentrat + 480 ml destilliertes Wasser
- * Verdünnungsmittel RD5C: 20 ml Konzentrat + 80 ml destilliertes Wasser
- * Substratlösung: Farbreagenzien A und B werden im Verhältnis 1 : 1 vermischt
- * IL-12 Standard: Zugabe von 5 ml Kalibrationslösung RD5C. Die neue Stammlösung hat eine Konzentration von 500 pg/ml. Diese Stammlösung wird zur Herstellung einer Verdünnungsreihe verwendet. Die Kalibratorlösung selbst dient als Nullstandard.

Vorgangsweise

1. 50 µl Verdünnungsmittel RD1F werden in jede Vertiefung pipettiert.
2. 200 µl IL-12 Standardlösung bzw. Probe werden zugegeben.
3. Inkubation für 2 h.
4. 3-maliges Waschen mit Hilfe der Waschlösung
5. 200 µl Konjugat werden zugegeben.
6. Inkubation für 2 h
7. 3-maliges Waschen mit Hilfe der Waschlösung
8. 200 µl Substratlösung werden zugegeben.
9. Inkubation für 20 min

10. 50 µl Stopplösung werden zugegeben. Innerhalb von 30 min soll die Absorptionsänderung bei 450 nm abgelesen werden. Im Vergleich mit der Standardkurve kann auf die IL-12-Konzentrationen in den Proben rückgeschlossen werden.

3. Nachweis der Migration von humanen dendritischen Zellen in der Maus

A. Material

Material und Methoden der Gewinnung dendritischer Zellen aus humanem Blut wurden im ersten Teil dieses Kapitels beschrieben.

Versuchstiere

Ich führte diese Experimente mit weiblichen, 2 - 6 Monate alten Inzuchtmäusen des Stammes BALB/c durch. Diese Tiere stammen aus der hauseigenen Zucht, die unter der Aufsicht von Dr. Franz Koch angelegt wurde. Für das intravenöse und subkutane Spritzen von Zellen liegt die Tierversuchsbewilligung des Bundesministeriums vor (GZ 66.009/368-I/A/2/92, GZ 66.011/70-Pr/4/94 und GZ 66.011/38-Pr/4/95).

Material zur Bearbeitung der Versuchstiere

- * Äther zur Betäubung der Mäuse
- * sterile 1 ml-Spritzen (Braun, Melsungen, D)
- * sterile Nadeln (Microlance 3, 27G 3/4, 0,4 x 19, Nr. 20, Becton Dickinson, Dublin, IR)
- * Alkohol zur Desinfektion
- * CO₂-Gas
- * 1 gebogene Schere, 1 gerade sterile Pinzette, 1 gebogene sterile Pinzette
- * Petri-Schalen (100 x 15 mm) (Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA)
- * sterile Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml) (Becton Dickinson, NJ, USA)
- * sterile Werkbank (Danlaf, Dänemark)

Material zur Bearbeitung der entnommenen Milzen bzw. Lymphknoten

Anfertigung von Zellsuspensionen aus Lymphknoten und Milz

- * R10
- * Ammoniumchlorid (NH₄Cl) 1,66 %
- * Filtersieb
- * Filter (39 µm Maschenweite) aus Nylongewebe für das graphische Gewerbe
- * Omnifuge (Heraeus Sepatech)
- * sterile Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml) (Becton Dickinson, NJ, USA)
- * Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (15 ml) (Costar, Cambridge, MA, USA)
- * Polystyrol-Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml) (Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA)
- * Objektträger (Elka, No. 2400)
- * Deckgläser 21 mm x 26 mm (Menzel-Glaser)
- * Vaseline
- * Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX60)

Anfertigung von Gefrierschnitten aus murinen Milzen:

- * Kryostat FRIGOCUT 2800 (Reichert-Jung)
- * PBS
- * Objektträger (Elka, No. 2400)
- * Deckgläser 21mm x 26mm (Menzel-Glaser)
- * Vectashield Eindeckmedium (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA)
- * Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX60)

B. Methodik

a. Markierung der reifen dendritischen Zellen mit Hilfe PKH 26

PKH 26-GL ist ein rot-fluoreszierender, lipophiler Farbstoff. Es kommt zum Einbau von aliphatischen Molekülen in die Zellmembran. Das Färbemuster ist abhängig vom Zelltyp und der Zellmembran. Die Färbung ist keine Sättigungsreaktion, sondern eine Funktion von Farbstoffkonzentration und Zellkonzentration. Überfärbung führt zu Verlust der Membranintegrität und Einschränkung der Zellerholung. Ich verwendete diesen Farbstoff zur Markierung von reifen dendritischen Zellen.

Material

- * einheitliche Zellkultur in R10
- * R10
- * RPMI 1640 oder PBS
- * PKH-26
 - a. Farbstoff 1 Ampulle 0,5 ml
 - b. Verdünnungsflüssigkeit C 1 Ampulle 10 ml
(Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA)
- * Hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS, Gibco, Paisley, Scotland)
- * Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (15 ml) (Costar, Cambridge, MA, USA)
- * Omnifuge (Heraeus Sepatech)
- * sterile Werkbank
- * Hämozytometer (Reichert)
- * Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)

Methodik

Alle Schritte werden bei Raumtemperatur durchgeführt.

1. Zellsuspension wird einmal in RPMI 1640 gewaschen (1000 U, 4 °C, 8 min)
Die Gesamtzellzahl sollte ungefähr 20 Millionen betragen.
2. Herstellung von 1ml einer 4µm PKH-26-Lösung unter Verwendung des Verdünnungsmittels C.
3. Das abzentrifugierte Pellet wird bis auf 25 µl von seinem Überstand befreit. Durch leichtes Klopfen auf den Röhrchenboden kommt es zur Vermischung der Zellen mit dem Restmedium. Danach wird 1 ml der Verdünnungslösung C zugegeben.
4. Zugabe der Zellsuspension (1 ml) zu der vorbereiteten Farbstofflösung. Dieser Vorgang soll schnell passieren.
5. Inkubation für 2-5 min bei Raumtemperatur.
6. 2 ml fetales Kälberserum werden zugegeben. Dadurch kommt es zum Stoppen der Färbereaktion.
7. Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur
8. Zugabe von 4 ml R10
9. Mindestens 3-maliges Waschen mit R10 (1000 U, 4 °C, 8 min)

Durch diese Färbung wird die Vitalität der Zellen nicht beeinträchtigt (Kontrolle im Hämozytometer).

b. Injektion der markierten Zellen in die Versuchstiere

1. Intravenöses Spritzen in die Schwanzvene
Markierte Zellen werden in PBS resuspendiert. Die Konzentration beträgt 1 Million Zellen auf 100 μ l PBS
 2. Subkutanes Spritzen in die Fußpfote
Die Konzentration beträgt 1 Million markierte Zellen auf 30 μ l PBS
- * Die Versuchstiere werden vor der Injektion mit Äther betäubt.
 - * Injektion
 - * 24 h Inkubationszeit

c. Evaluation der Zellwanderung

Entnahme von Lymphknoten und Milzen:

1. Anfertigung von 15 μ m-Gefrierschnitten aus den Milzen von behandelten und unbehandelten Mäusen (Negativkontrolle). Die Schnitte werden auf Objektträger aufgebracht und mit Vectashield eingedeckt
2. Anfertigung von Zellsuspensionen mit Hilfe eines Filtersiebes und eines Nylonfilters. Im Falle der Milzzellsuspension wird noch eine Erythrolyse mit Ammoniumchlorid durchgeführt, um die Erythrozyten zu entfernen. Die Suspensionen werden abzentrifugiert und mit PBS gewaschen, bevor sie auf Objektträger aufgetragen und abgedeckt werden. Zur Fixierung der Suspension zwischen Objektträger und Deckglas verwendet man Vaseline. Die Zellsuspensionen wurden also noch im viablen Zustand beurteilt.

d. Beurteilung im Fluoreszenzmikroskop

III. RESULTATE

Entsprechend meiner Fragestellung möchte ich auch dieses Kapitel in drei Abschnitte unterteilen.

1. Die Gewinnung und Kultivierung dendritischer Zellen aus humanem Blut.
2. Einfluß von verschiedenen Stimulantien auf die Hochregulation der Interleukin-12-Produktion durch humane dendritische Zellen
3. Nachweis der Migration von humanen dendritischen Zellen im Mausmodell

1. Die Gewinnung und Kultivierung dendritischer Zellen aus humanem Blut

Die Entwicklung der Methodik zur Gewinnung von dendritischen Zellen aus humanem Blut ist zur Zeit noch nicht abgeschlossen. Die Studien von Romani et al. und Bender et al. (184, 185) zu diesem Thema sind noch nicht publiziert. Meine Beobachtungen im Rahmen der Zellgewinnung und Kultivierung werden anschließend erörtert.

A. Anteil dendritischer Vorläuferzellen bzw. reifer dendritischer Zellen an den PBMCs

Die Separation von Erythrozyten und Granulozyten durch Zenrifugation mit Hilfe von Lymphoprep führt zur Gewinnung von PBMCs (peripheral blood mononuclear cells). Die Menge an PBMCs, die man aus einem Blutzellkonzentrat von 100 ml erhält, bewegt sich zwischen 300 und 800 Millionen Zellen. Das Konzentrat von 100 ml entspricht 400 ml Vollblut.

Durch die verschiedenen Methoden der Lymphozytendepletion (siehe Kapitel Material und Methodik) kommt es zur Entfernung der B- und T-Lymphozyten, die einen

Großteil der weißen Blutzellen ausmachen. Durch zweimalige Depletion bzw. durch Anwendung des Adhärenzverfahrens kommt es zu einer Reduktion der Zellzahl auf 10 - 20 %. Die verschiedenen Depletionsmethoden unterscheiden sich in ihren Ausbeuten nur geringfügig.

Im Rahmen der Kultivierung bis zum Tag 7 kann man weiters einen Zellverlust beobachten, der möglicherweise durch die 3-malige Fütterung und durch das "Kleben-Bleiben" von Zellen bei der Abnahme der Zellsuspensionen bedingt ist. Die Menge der gewonnenen dendritischen Vorläuferzellen am Tag 7 beläuft sich auf ungefähr 25 % der depletierten Zellfraktion von Tag 0.

Um reife dendritische Zellen zu gewinnen ist es notwendig, die Zellen von Tag 7 bis Tag 10 erneut in Kultur zu bringen. Die Reifung erfordert den Zusatz von MCM in einem Verhältnis von 1 : 3 zum Standardkulturmedium. Die Weiterkultivierung ist wiederum mit einem Zellverlust verbunden, sodaß die am Tag 10 gewonnenen Zellen nur noch zwischen 2 % und 8 % der depletierten Zellfraktion von Tag 0 ausmachen.

Diese Zellen sind nun reif und zeigen sowohl morphologisch als auch funktionell die Charakteristika von reifen dendritischen Zellen.

Interessant ist die Beobachtung, daß die Kultivierung mit TNF- α zu einer Erhöhung der Ausbeute führt. Allerdings entspricht die Reifung der Zellen nicht derjenigen, wie sie mit Hilfe von MCM erreicht wird.

B. Unterschiede der verschiedenen Depletionsmethoden

*** Immunomagnetische Depletion mit Hilfe von Dynabeads**

Die direkte und indirekte Depletion mit Hilfe von magnetisierbaren Polystyrenkörperchen führt zur Abtrennung von B- und T-Lymphozyten. Durch häufige Verwendung beider Methoden schien mir, daß die Verunreinigung der gewonnenen Zellfraktion durch Lymphozyten bei Anwendung der direkten Methode geringer ist.

*** Depletion der Lymphozyten aufgrund ihrer Unfähigkeit zu adhären**

Die sauberste Abtrennung der Lymphozyten von den dendritischen Vorläuferzellen wurde durch die Adhärenzmethode erreicht (Methode siehe oben). Auffällig allerdings ist die Beobachtung, daß die Kulturen mit nach dieser Methode gewonnenen

Vorläuferzellen nach einigen Tagen krümelige Verunreinigungen zeigen, die einer bakteriellen Infektion der Kultur ähnlich schauen. Möglicherweise stammen diese Verunreinigungen von dem humanen Gammaglobulin, das zur Beschichtung der Kulturschalen verwendet wurde. Es kommt dadurch allerdings nicht zu einer Beeinträchtigung der Zellreifung.

C. Einfluß von MCM auf die Ausreifung dendritischer Vorläuferzellen

Monozyten-konditioniertes Medium (MCM) enthält Faktoren, die für die Ausreifung von dendritischen Vorläuferzellen große Bedeutung haben. Die Faktoren sind allerdings noch nicht definiert.

Es hat sich gezeigt, daß die Zugabe von MCM von Tag 7 bis Tag 10 zu einer Reifung dendritischer Zellen führt, die bei Kultivierung ohne MCM ausbleibt. Der Reifungsgrad der dendritischen Zellen wird mit Hilfe des CD83-Oberflächenmembranproteins festgestellt, das nur auf reifen dendritischen Zellen exprimiert wird. Das CD83 Molekül ist deshalb als Reifungsmarker geeignet (177).

Der Nachweis erfolgt mit Hilfe einer Fluoreszenzfärbung, die im Durchflußzytometer ausgewertet wird.

Die Abbildungen 3.1 bis 3.3 zeigen ein Beispiel einer Population von reifen dendritischen Zellen.

Die Abb. 3.1 dient der Charakterisierung der Zellpopulation. Die x-Achse zeigt die Zellgröße (Vorwärtsstreuung, "Forward scatter"), die y-Achse die Granularität der Zellen (Seitwärtsstreuung, "Side scatter").

Die Abb. 3.2 zeigt die Auswertung der mit dem Kontrollantikörper inkubierten DZs. Das ist ein Antikörper derselben Immunglobulinklasse (Isotyp) und in derselben Konzentration wie der Anti-CD83-Antikörper. Die x-Achse gibt die Fluoreszenz an, die y-Achse die Zellzahl. Die Fluoreszenz ist niedrig, das Ergebnis wie zu erwarten negativ.

Die Abb. 3.3 zeigt die Auswertung der mit dem Anti-CD83-Antikörper inkubierten DZs an. Die Fluoreszenz ist wesentlich höher, das Ergebnis positiv. In diesem Fall handelt es sich um großteils (90 %) reife dendritische Zellen.

Abbildung 3. 1

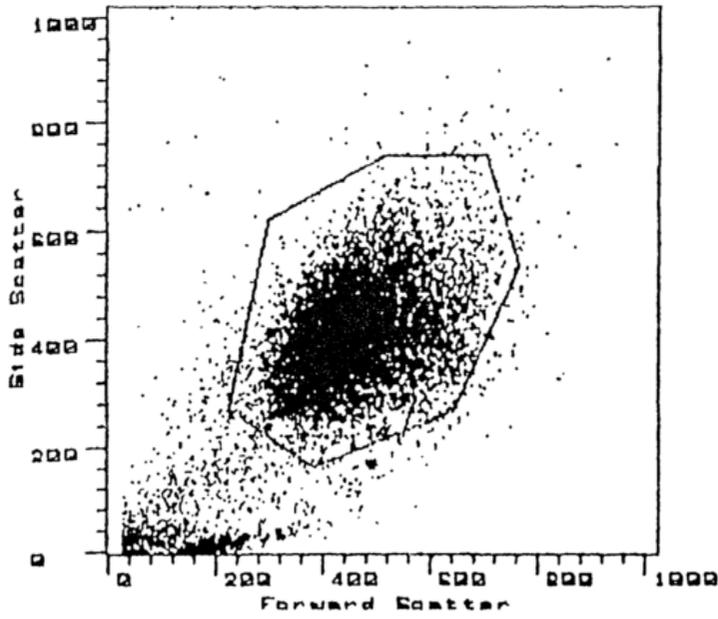


Abbildung 3. 2

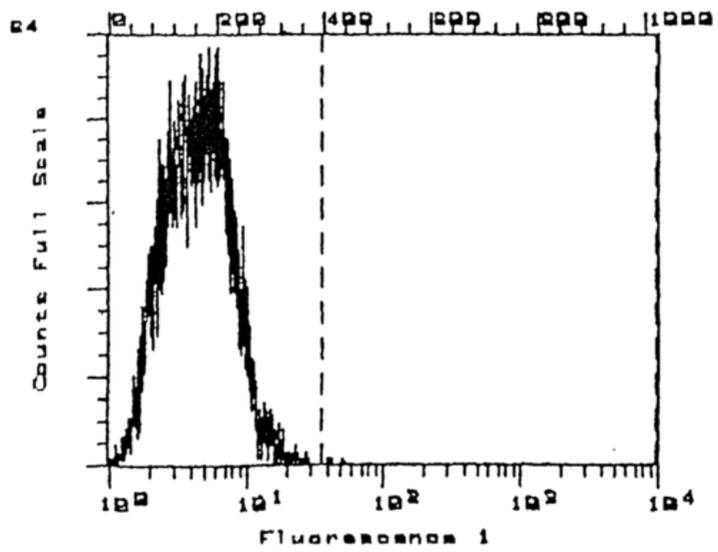
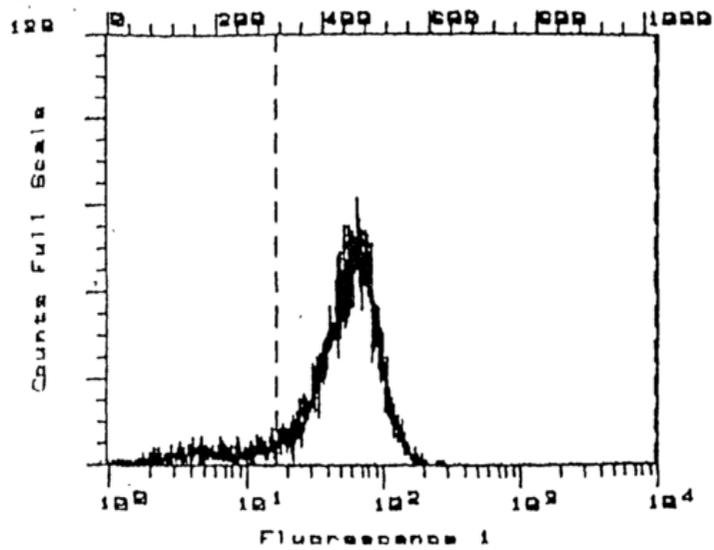


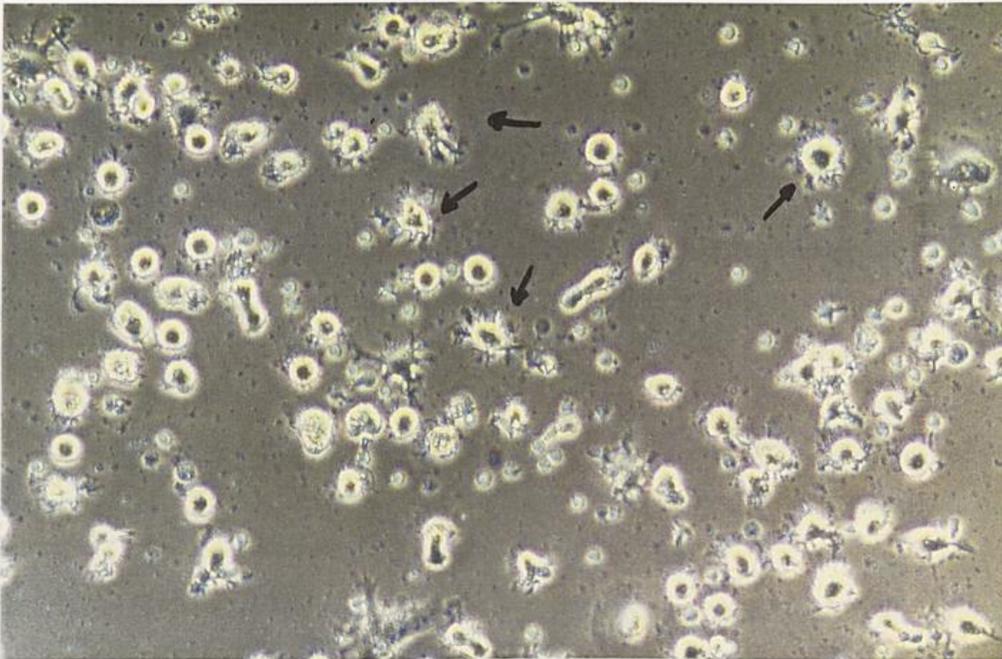
Abbildung 3. 3



Auch morphologisch sind reife dendritische Zellen von Unreifen zu unterscheiden. Das eindrücklichste Merkmal ist die Ausbildung von zytoplasmatischen Ausläufern, die den Zellen ein Sonnen-artiges Aussehen verleihen. Diese sogenannten "veils" kann man im Phasenkontrastmikroskop sehr gut beobachten.

Die nachfolgende Abbildung zeigt das typische Erscheinungsbild von reifen dendritischen Zellen im Phasenkontrastmikroskop.

Abb. 3.4



2. Einfluß von verschiedenen Stimulantien auf die Hochregulation der Interleukin-12 Produktion durch humane dendritische Zellen

A. Humane dendritische Zellen produzieren Interleukin-12 als Antwort auf die Stimulation des CD40 Moleküls

Koch et al. zeigten in ihren Experimenten im Maussystem, daß die Stimulation des CD40 Moleküls zur Produktion von IL-12 führt. Die Stimulation erfolgte sowohl mit CD40 Ligand als auch mit Anti-CD40-Antikörpern. Durch Zugabe von murinen Anti-CD40 Ligand-Antikörpern konnte die IL-12-Produktion inhibiert werden (165).

In Anlehnung an diese Experimente untersuchte ich diesen Sachverhalt im Humansystem.

Die Tabelle 3.1 zeigt, daß humane dendritische Zellen tatsächliche signifikante Mengen des p70 Heterodimers von IL-12 in Antwort auf die Ligation des CD40 Moleküls bilden. In den Supernatanten von unstimulierten DZs konnte kein IL-12 gemessen werden. Das bedeutet, daß ohne Stimulus entweder überhaupt kein IL-12 gebildet wird, oder daß die Werte unter der Sensitivitätsschwelle des ELISAs von 5 pg/ml lagen.

Ein Kontrollantikörper derselben Immunglobulinklasse (OKT-6/CD1a) wie der stimulierende Anti-CD40-Antikörper war ebenfalls negativ. Dies unterstreicht die Spezifität des via CD40 vermittelten Signals:

CD40 und CD1a sind auf dendritischen Zellen in vergleichbaren Mengen exprimiert (178, 183). Nur die Ligation des CD40 Moleküls jedoch vermag IL-12 Produktion zu induzieren.

Zwischen den verschiedenen Inkubationszeiten wurden keine Unterschiede gefunden. Der monoklonale Antikörper G28.5 war wirkungsvoller als der, ein anderes Epitop erkennende MAB89. Höhere oder niedrigere Antikörperkonzentrationen als 10 mg/ml erwiesen sich als unwirksam. Die erwartete Erhöhung der IL-12 Produktion durch Immobilisierung des Antikörpers am Boden des Kulturgefäßes trat nicht ein. Im Gegenteil, diese Ansätze waren negativ. Die Gründe dafür konnten in dieser Arbeit nicht näher untersucht werden.

Die anschauliche Darstellung dieser Daten erfolgt in der Tabelle 3.1.

Tabelle 3.1

Humane dendritische Zellen produzieren IL-12 p70 Heterodimer über
Stimulation des CD40 Moleküls

Stimulus	IL-12 p70 Heterodimer (pg/ml)						
	Exp. Nr. 1 (48h)	Exp. Nr. 2 (24h)	Exp. Nr. 3 (48h)	Exp. Nr. 4 (72h)	Exp. Nr. 5 (48h)	Exp. Nr. 6 (72h)	
kein Stimulus	0	0	0	0	0	0	pg/ml
Anti-CD40-Antikörper 1 : 50	8,8	29,8	52,3	46,4	>500	456	pg/ml
OKT 6 (Negativkontrolle)	0	0	0	0	0	0	pg/ml

unreife DZs

reife DZs

Legende: Die dendritischen Zellen wurden 24 h, 48 h bzw. 72 h mit den jeweiligen Stimulantien inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen und mit Hilfe des ELISAs auf die Anwesenheit von IL-12-Heterodimer untersucht.

Die Behandlung der Zellen erfolgte in den oben genannten Experimenten immer durch einfache Zugabe der Antikörper.

Die dendritischen Zellen der Experimente 1, 5 und 6 waren unreif, in den übrigen Experimenten wurden mit MCM ausgereifte DZs verwendet.

Die Experimente Nr. 2 - 6 wurden mit dem Anti-CD40-Antikörper G 28. 5 durchgeführt. Der Antikörper wurde jeweils im Verhältnis 1 : 50 zugegeben.

Das Experiment Nr. 1 wurde mit dem Anti-CD40-Antikörper MAB89 durchgeführt.

B. Dendritische Zellen produzieren IL-12 auf die Stimulation mit bakteriellem Antigen

Heufler et al. (93) zeigten in ihren Experimenten, daß sowohl murine als auch humane dendritische Zellen auf die Stimulation durch hitzeinaktiviertes Staphylococcus aureus-Antigen mit IL-12 Produktion antworten.

In meinen Experimenten konnte ich diese Daten bestätigen und erweitern. Es zeigte sich, daß das Ausmaß der IL-12 Antwort sowohl von der Konzentration des Staphylococcus aureus-Antigens als auch vom Reifungsgrad der dendritischen Zellen abhängt.

Auch hier ergaben längere Inkubationszeiten keine vermehrte IL-12 Produktion.

Ein Grund für die Schwankungen der Werte zwischen den einzelnen Experimenten konnte nicht erklärt werden. Die bewußt bestimmten experimentellen Parameter wie Zellzahl, Zelldichte, Volumen, Inkubationszeiten, Kulturmedium waren vergleichbar.

Der Stimulus SACS ruft bei dendritischen Zellen in Abhängigkeit von der Intensität des Stimulus unterschiedliche Antworten hervor. Es zeigte sich, daß die Konzentration 1 : 1000 wesentlich effizienter stimuliert als die Konzentration 1 : 10000.

Weiters ist die Reaktion der dendritischen Zellen vom Reifungsgrad dieser stark abhängig. Unreife Zellen sind wesentlich besser stimulierbar als reife Zellen.

In der Tabelle 3.2 wird dieser Sachverhalt anschaulich dargestellt.

Tabelle 3.2

Dendritische Zellen produzieren IL-12 als Antwort auf SACS

Stimulus	Exp.									
	Nr. 1 24h	Nr. 1 48h	Nr. 2 48h	Nr. 2 72h	Nr. 2 48h	Nr. 2 72h	Nr. 3 48h	Nr. 3 72h	Nr. 3 48h	Nr. 3 72h
SACS 1 : 1000	> 500	465	148	76	0	0	> 500	> 500	28,3	27,7
SACS 1 : 10000	351	259	0	0	0	0	0	0	0	24,5
kein Stimulus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

unreife DZs

reife DZs

Legende:

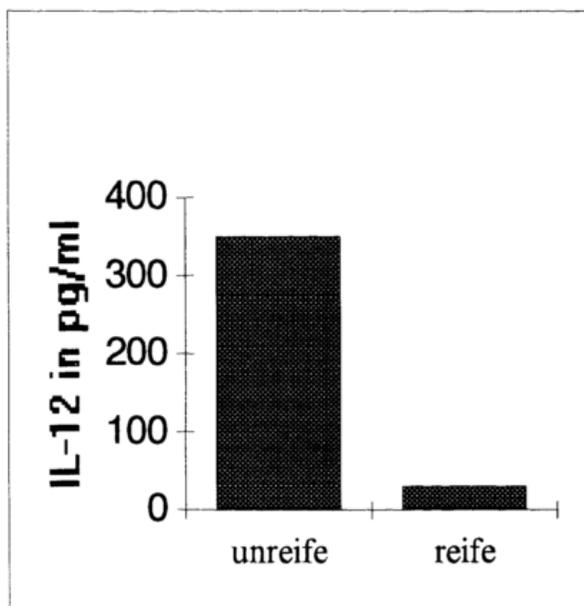
Der Stimulus SACS ruft bei dendritischen Zellen unterschiedliche Antworten hervor in Abhängigkeit der Intensität des Stimulus und des Reifungsgrades der Zellen.

C. Unreife dendritische Zellen lassen sich zur Produktion größerer Mengen IL-12 stimulieren als reife dendritische Zellen.

Sowohl in den Experimenten mit SACS als auch in jenen mit Anti-CD40-Antikörpern wurde deutlich, daß es einen Unterschied in der Stimulierbarkeit zwischen unreifen und reifen dendritischen Zellen gibt.

Unreife DZs sind wesentlich besser stimulierbar.

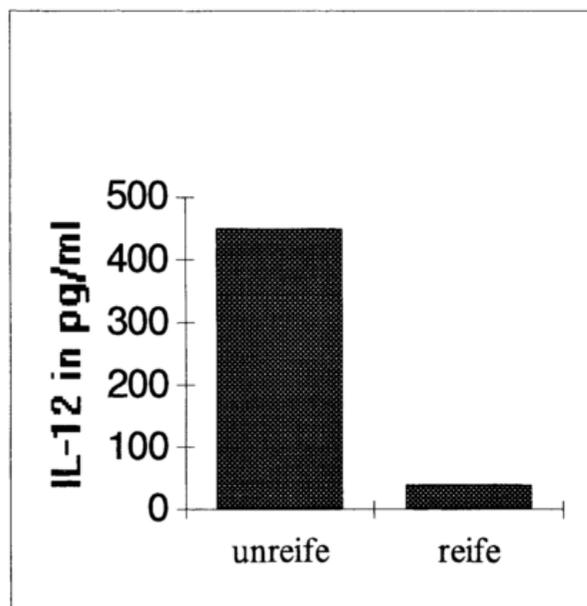
Durch die Summation aller Einzelerperimente wird dieser Sachverhalt in den nachfolgenden Abbildungen 3.5 und 3.6 anschaulich dargestellt. Unreife dendritische Zellen sezernieren 10 - 15mal mehr Interleukin 12 als reife dendritische Zellen.



Legende:

Stimulation durch Anti-CD40-Antikörper

Abb. 3.5



Stimulation durch SACS

Abb. 3.6

D. Die Reaktion humaner dendritischer Zellen auf weitere Stimulan- tien

Koch et al. zeigten in ihren Studien im Maussystem (165), daß dendritische Zellen auf die Stimulierung des MHC-Klasse-II Moleküls mit der Produktion von IL-12 antworten. In Anlehnung an diese Experimente stellte sich die Frage, ob diese Feststellung auch für das Humansystem zulässig sei.

Ich versuchte, dendritische Zellen mit MHC-Klasse-II Antikörpern zu stimulieren. Sowohl die Experimente mit Antikörpern gegen den Haplotyp HLA DR (HB55) als auch jene mit Antikörpern gegen die Haplotypen HLA DR und DQ (9.3F10) zeigten in allen Versuchsansätzen negative Ergebnisse, obwohl sowohl reife als auch unreife dendritische Zellen große Mengen von Klasse II Molekülen an ihrer Oberfläche exprimieren.

Die Feststellung der Arbeitsgruppe um Koch kann also zur Zeit nicht auf das Humansystem ausgedehnt werden.

Phytohämagglutinin und Concanavalin A sind Lectine mit der Eigenschaft, durch polyvalente Bindungen zu Zellagglutination zu führen. Dadurch können dendritische Zellen und T-Zellen unspezifisch aneinander gebunden werden. Dabei kommt es zu einer starken, polyklonalen Aktivierung der T-Zellen.

Es stellte sich die Frage, ob es dadurch zu einer Hochregulation der IL-12 Synthese kommt.

1. Die Experimente wurden teilweise ohne zusätzliche Zugabe von T-Zellen durchgeführt in der Annahme, daß durch die Depletion nicht alle T-Zellen entfernt wurden. Die "verunreinigenden" T-Zellen wurden mit den Lectinen mit den dendritischen Zellen vernetzt.
2. Der zweite Teil dieser Experimente wurde mit Hilfe von T-Zell-Zugabe durchgeführt. Die T-Zellen wurden davor mit Phytohämagglutinin aktiviert. Nach zwei Tagen konnte eine T-Zell-Aktivierung in Form von Ausbildung von T-Zell-Blasten beobachtet werden. Der Kulturansatz erfolgte dann mit 1 Million T-Zellen und 1 Million dendritischen Zellen in 2 ml R10.

Die Reagentien wurden jeweils in einer Konzentration von 100 ng/ml verwendet. Alle Versuchsansätze mit den genannten Lectinen verliefen jedoch ohne positive Ergebnisse.

Ebenfalls negativ verliefen die Experimente mit Anti-MHC-Klasse-I Antikörpern (HB95) und Lipopolysaccharid.

3. Nachweis der Migration von humanen dendritischen Zellen im Mausmodell

Austyn et al. (26) und Kupiec-Weglinski et al. (173) zeigten in ihren Studien das Migrationsverhalten exogen zugeführter muriner dendritischer Zellen in der Maus. Sie demonstrierten die Wanderung der Zellen einerseits von der Blutbahn in die Milz und andererseits von der Subkutis in die regionären Lymphknoten. Die Markierung der Zellen erfolgte zum einen Teil radioaktiv und zum anderen Teil mit einem Fluoreszenzfarbstoff.

In diesem Teil meiner Arbeit beschäftigte ich mich mit der Wanderung humaner dendritischer Zellen in der Maus. Es stellte sich die Frage, ob sich das Mausmodell zum Studium des Migrationsverhaltens humaner dendritischer Zellen eignet.

Die Markierung der Zellen erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH-26. Dieser lipophile Fluoreszenzfarbstoff kann zur Färbung vitaler Zellen verwendet werden, ohne daß deren Eigenschaften beeinträchtigt werden.

A. Intravenös verabreichte humane dendritische Zellen wandern in die Milz

Humane Fluoreszenz-markierte dendritische Zellen wurden in einer Menge von 1 Million in 100 µl PBS in die Schwanzvene des Versuchstieres appliziert. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde die Milz entnommen. Die Suche nach den applizierten Zellen erfolgte sowohl in Milzzellsuspensionen als auch in Gefrierschnitten.

In den Milzzellsuspensionen konnten die humanen fluoreszierenden Zellen deutlich von den murinen Zellen unterschieden werden. Der Anteil machte ungefähr

2 % aus.

Auch in den Gefrierschnitten waren PKH-26-positive Zellen deutlich erkennbar. Durch Wanderung der markierten Zellen in die "weißen Zonen" der Milz konnten diese deutlich von der roten Pulpa abgegrenzt werden. Außerdem konnte eine Anhäufung von applizierten Zellen in der Marginalzone festgestellt werden.

Aufgrund der starken Autofluoreszenz wurden vergleichsweise Gefrierschnitte von Milzen unbehandelter Versuchstiere angefertigt. Die Autofluoreszenz stellte sich im Vergleich zur Fluoreszenz der markierten Zellen als wesentlich schwächer heraus. Durch Einbau des PKH-26 in die Zellmembran der dendritischen Zellen waren diese häufig als Ringe zu erkennen, die sich deutlich von der Hintergrundfluoreszenz abhoben.

B. Subkutan verabreichte humane dendritische Zellen finden sich in den regionären Lymphknoten.

Austyn (26) und Kupiec-Weglinski (173) beobachteten in ihren Experimenten den Weg von subkutan verabreichten murinen dendritischen Zellen in die regionären Lymphknoten. Sie applizierten die Zellen in die Fußpfote des Versuchstieres und fanden diese in den poplitealen Lymphknoten wieder.

Heidrun Moll (174) zeigte in ihren Arbeiten im Zusammenhang mit der kutanen Leishmaniasis die Wanderung infizierter dendritischer Zellen von der Haut in die regionären Lymphknoten. Sie verwendete zum Nachweis den oben genannten Fluoreszenzfarbstoff PKH-26.

In Anlehnung an diese Studien versuchte ich, humane subkutan injizierte Zellen in ihrer Wanderung zu beobachten. Die Markierung erfolgte wiederum durch PKH-26.

Die humanen dendritischen Zellen wurden in einer Menge von 1 Million auf 30 μ l PBS in die Subkutis der Fußpfote des Versuchstieres injiziert. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die poplitealen Lymphknoten entnommen. Die Suche nach den applizierten Zellen erfolgte durch Herstellung von Zellsuspensionen der Lymphknoten.

Das Problem dieses Experimentes lag vor allem in der Isolierung der "winzigen" poplitealen Lymphknoten, da sich diese nur sehr geringfügig von Binde- und Fettgewebe unterscheiden.

Um eine Fehldeutung der Autofluoreszenz auszuschließen wurden wiederum Zellsuspensionen von Lymphknoten unbehandelter Mäuse zum Vergleich hergestellt. Zur exakten Lokalisierung der Lymphknoten wurden 30 μ l Tinte in die Subkutis der Fußpfote verabreicht. Aufgrund der Kolloidalität von Tinte wird diese von Makrophagen aufgenommen und in die regionären Lymphknoten transportiert. Diese schimmern dadurch leicht bläulich und lassen sich dadurch leichter erkennen.

IV. DISKUSSION

Ich möchte dieses Kapitel in zwei Abschnitten erörtern:

1. Einfluß von verschiedenen Stimulantien auf die Hochregulation der Interleukin-12-Produktion von dendritischen Zellen.
2. Nachweis der Migration von humanen dendritischen Zellen in der Maus

1. Einfluß von verschiedenen Stimulantien auf die Hochregulation der Interleukin-12-Produktion durch dendritische Zellen

In diesem Teil meiner Dissertation machte ich zwei neue, bisher noch nicht beschriebene Beobachtungen.

- A. Humane dendritische Zellen produzieren substantielle Mengen von IL-12 in Antwort auf die Bindung des CD40 Moleküls.
- B. Unreife dendritische Zellen können zur Sekretion deutlich größerer Mengen von IL-12 angeregt werden als reife dendritische Zellen.

A. Der CD40 Weg der IL-12-Stimulation

Heufler et al. beschrieben erstmals, daß murine DZ auf T-Zell-Kontakt hin ihre IL-12 Produktion hochregulieren (93). Koch et al. erweiterten diese Befunde und zeigten, daß es das CD40 Molekül ist, welches das IL-12-stimulierende Signal in die dendritische Zelle transduziert (165). Im Humansystem gibt es diesbezüglich Daten von Despesse (182), die zeigen, daß in Monozyten IL-12 via CD40 induziert werden kann.

Die Daten meiner Dissertation sind der erste Bericht, daß dieser Signaltransduktionsweg auch für humane dendritische Zellen gilt. Im Vergleich zu Monozyten (183) produzieren dendritische Zellen, insbesondere unreife dendritische Zellen deutlich mehr IL-12. Ein deutlicher Unterschied zur Arbeit von Delespesse besteht in der Art der Stimulation:

Delespesse stimulierte die Monozyten mit Antigen-spezifischen T-Lymphozyten. Die daraufhin erfolgende IL-12 Produktion ließ sich durch Antikörper gegen den CD40 Liganden hemmen. Daraus wurde geschlossen, daß die Signaltransduktion über das CD40 Molekül erfolgt. Ein möglicher, unter Umständen notwendiger Beitrag durch andere Zelloberflächenmoleküle der Monozyten konnte in diesem System nicht untersucht werden.

In Erweiterung der Daten von Delespesse kann aus meinen Experimenten, bei denen die Stimulation von reinen DZ-Populationen mit einem definierten Stimulus (d. h. Anti-CD40-Antikörper) erfolgte, geschlossen werden, daß die **Ligation des CD40 Moleküls alleine** genügt, um IL-12 in dendritischen Zellen zu induzieren. Außerdem kann ein möglicher Beitrag durch T-Lymphozyten ausgeschlossen werden.

In meinen Experimenten waren die Ansätze mit T-Zellen oder mit MHC-Klasse-II und I monoklonalen Antikörpern erfolglos. Es konnte keine IL-12 Produktion in dendritischen Zellen hochreguliert werden. Der Frage, ob dies aus technischen Gründen so war, oder ob diese Stimuli wirklich keine relevanten Signale in die dendritischen Zellen übermitteln, konnte ich nicht weiter nachgehen. Erstere Erklärung ist aber wahrscheinlicher.

Signaltransduktion erfolgt in der Regel dann, wenn Zelloberflächenmoleküle vernetzt werden ("cross-linking"). Cross-linking ist immer effizienter, wenn die entsprechenden Liganden immobilisiert sind, sei es auf dem Boden der Kulturgefäße oder auf der Oberfläche von Zellen. Es erscheint deshalb nicht verwunderlich, daß die Stimulation der dendritischen Zellen mit Anti-MHC-Antikörpern wirkungslos war. Umgekehrt

jedoch erscheint es bemerkenswert, daß die Stimulation mit löslichen Anti-CD40-Antikörpern so deutlich war.

Als sinnvolle Weiterführung und Ergänzung meiner Experimente bietet sich an, dendritische Zellen mit dem physiologischen Liganden für CD40 zu stimulieren. Dieses Reagenz gibt es (168), es war mir aber zum Zeitpunkt meiner Arbeit nicht verfügbar.

B. IL-12 Produktion von unreifen und reifen dendritischen Zellen

Die deutlichen Unterschiede zwischen reifen und unreifen dendritischen Zellen sind bemerkenswert. Sie sind nicht auf Unterschiede in der Expression von CD40 zurückzuführen, da bei getesteten, in GM-CSF und IL-4 gezüchteten DZ die CD40 Expression auf reifen und unreifen dendritischen Zellen ungefähr gleich hoch ist. Reife dendritische Zellen haben eher noch etwas mehr CD40 auf ihrer Oberfläche als unreife, sie sezernieren aber weniger IL-12 in Antwort auf die CD40 Ligation.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt kann keine befriedigende Interpretation dieses Phänomens angeboten werden. Sehr spekulativ könnte man argumentieren, daß reife dendritische Zellen, die im Lymphknoten die T-Zellen sensibilisieren, keine großen Mengen von IL-12 benötigen. Die Interaktion zwischen der reifen dendritischen Zelle und der Antigen-spezifischen T-Zelle findet auf engstem Raum statt. Auch kleine Mengen von Interleukin-12 könnten im winzigen Interzellularraum zwischen dendritischer Zelle und T-Zelle hohe und vor allem wirkungsvolle IL-12-Konzentrationen entstehen lassen.

In Bezug auf die unreifen dendritischen Zellen ist es wichtig, andere Typen von unreifen DZs zu untersuchen, z. B. frisch isolierte Langerhanszellen der Epidermis oder direkt aus dem Blut isolierte CD11c-dendritische Zellen (117).

Die physiologische Bedeutung in vivo der mit GM-CSF und IL-4 gezüchteten unreifen Zellen ist nämlich noch ungeklärt.

C. Mögliche Bedeutung der IL-12 Produktion von dendritischen Zellen in vivo

Die Interleukin-12 Produktion von dendritischen Zellen, insbesondere deren deutliche Verstärkung bei Bindung des CD40 Moleküls oder bei Kontakt mit T-Lymphozyten könnte bedeuten, daß dendritische Zellen primäre Immunantworten in Richtung Th1 Antworten lenken. Das wäre, bei Abwesenheit von gegenregulatorischen Zytokinen der normale Weg.

Da dendritische Zellen mehr IL-12 produzieren als andere Antigen-präsentierende Zellen (z. B. B-Zellen, Makrophagen), sind sie stärkere Induktoren von Th1 Antworten, d. h. von INF- γ produzierenden T-Lymphozyten. Th1 Antworten resultieren in verstärkter Zell-vermittelter Immunität, einschließlich zytotoxischer Aktivität.

Genau das ist erwünscht, wenn erwogen wird, dendritische Zellen für die Tumorthherapie einzusetzen. Tumorantigene, bzw. immunogene Peptide davon wurden auf dendritische Zellen appliziert. Im Gegensatz zu mikrobiellen Antigenen (wie in dieser Arbeit beispielsweise SACS) induzieren Peptide per se keine Interleukin-12 Produktion. Umso wichtiger ist es, daß die von einem künftigen Experimentator/Therapeuten verabreichten Tumorantigen-beladenen dendritischen Zellen bei Ankunft im Lymphknoten ausreichend IL-12 sezernieren, um eine wirkungsvolle Zellvermittelte/zytotoxische Anti-Tumor-Antwort auszulösen. Die Daten meiner Arbeit zeigen, daß humane dendritische Zellen das sehr gut können.

2. Nachweis der Migration humaner dendritischer Zellen im Mausmodell

A. Intravenös verabreichte humane dendritische Zellen wandern in die Milz

Austyn et al.(26) zeigten in ihren Studien, daß intravenös verabreichte murine dendritische Zellen sich nach 24h in den T-Zell-abhängigen Arealen der weißen Pulpa wiederfinden. In Anlehnung an diese Feststellung beobachtete ich die Wanderung von humanen intravenös applizierten DZs im Mausmodell.

Sowohl in den Gefrierschnitten als auch in den Milzzellsuspensionen konnten applizierte Zellen, die zuvor Fluoreszenz-markiert worden waren, beobachtet werden. In den Schnitten konnte eine deutliche Anreicherung in der weißen Pulpa und in der Marginalzone festgestellt werden.

B. Subkutan verabreichte humane dendritische Zellen finden sich in den regionären Lymphknoten

Austyn (26), Kupiec-Weglinski (173) und Moll (174) beschrieben in ihren Arbeiten das Migrationsverhalten subkutan verabreichter muriner dendritischer Zellen in der Maus. Sie fanden die Zellen in den regionären Lymphknoten wieder und schlossen dadurch auf eine Wanderung über die afferenten Lymphgefäße.

Ich versuchte in meinen Experimenten, das Verhalten von humanen, subkutan applizierten dendritischen Zellen zu erkunden. Die Ergebnisse waren jedoch nur schwach positiv. Es konnte zwar die Zell-bezogene Fluoreszenz von der Hintergrund-

fluoreszenz abgegrenzt werden, die Intensität war jedoch im Vergleich zu den Milz-zellsuspensionen wesentlich geringer.

Mögliche Ursachen:

- * Es stellte sich die Frage, ob eine Inkubationszeit von 24 h für die Wanderung der Zellen über die afferenten Lymphgefäße in die poplitealen Lymphknoten zu kurz sei.
- * Eine zweite Möglichkeiten der Erklärung könnten Abwehrreaktionen von Seiten der Maus darstellen. Um diese Problematik auszuschließen wären Experimente mit SCID-Mäusen (severe combined immuno-deficiency) durchzuführen. Dies war mir im Rahmen meiner Arbeit leider nicht möglich.

Für die Zukunft wäre außerdem eine Verfeinerung der Experimente durch Verwendung von sowohl reifen als auch unreifen dendritischen Zellen interessant.

C. Klinische Relevanz der Migration applizierter dendritischer Zellen

Migration ist notwendig, wenn erwogen wird, dendritische Zellen im Rahmen einer Tumorthherapie einzusetzen. Tumorantigene würden auf dendritische Zellen appliziert und dem Patienten verabreicht. Die Zellen wandern dann in die regionalen Lymphknoten, um dort eine Zell-medierte/zytotoxische Anti-Tumor-Antwort auszulösen.

Migrationsstudien sind wichtig, um das Verhalten applizierter dendritischer Zellen zu beobachten und um festzustellen, ob die Vorstellung eines Einsatzes in der Tumorthherapie in die Realität umgesetzt werden kann.

Meine Experimente zeigen, daß das xenogene Mausmodell zum Studium des Wanderungsverhaltens humaner dendritischer Zellen grundsätzlich geeignet ist.



Zusammenfassung:

Dendritische Zellen sind eine Klasse von Leukozyten mit speziellen immunostimulatorischen Eigenschaften. Sie sind Antigen-präsentierende Zellen und nach heutigem Wissensstand die einzigen Zellen, die die Fähigkeit besitzen, naive T-Zellen, d. h. bisher nicht mit Antigen in Berührung gelangte T-Zellen zu aktivieren. Nur sie sind in der Lage, eine primäre Immunantwort auszulösen.

Steinman hat die Aufgaben der dendritischen Zellen in drei Bereiche aufgeteilt:

- I. DZs als periphere Wachposten des Immunsystems - Aufnahme und Prozessierung von Antigen.
- II. DZs wandern von der Peripherie in lymphatische Gewebe, um dort auf Antigen-spezifische T-Zellen zu treffen.
- III. DZs stimulieren ruhende T-Zellen.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den letzten beiden Funktionsbereichen der dendritischen Zellen:

A. IL-12 als zentrales Zytokin sowohl in der angeborenen als auch in der erworbenen Abwehr spielt in der Funktion der dendritischen Zellen eine bedeutende Rolle. Dendritische Zellen produzieren im Rahmen ihrer Interaktion mit T-Zellen IL-12, welches als Promoter der Entwicklung von T-Helferzellen Typ 1 agiert. Es stellte sich die Frage, welche Mechanismen zu einer Hochregulation der IL-12 Produktion durch dendritische Zellen führen. Im Rahmen dieser Arbeit kam ich zu folgenden Ergebnissen:

- * Humane dendritische Zellen produzieren IL-12 als Antwort auf die Stimulation des CD40 Moleküls.
- * Humane dendritische Zellen produzieren IL-12 als Antwort auf die Stimulation mit bakteriellem Antigen
- * Unreife dendritische Zellen lassen sich zur Produktion größerer Mengen IL-12 stimulieren als reife dendritische Zellen.

B. Die Migration dendritischer Zellen ist notwendig, um primär auf Oberflächenepithelien aufgetroffene Antigene mit den T-Zellen in den lymphatischen Geweben in Kontakt zu bringen. Diese Arbeit beschäftigte sich mit der Maus als xenogenem Modell zum Studium des Migrationsverhaltens humaner dendritischer Zellen.

- * Intravenös verabreichte humane DZs wandern in die Milz. Die Auffindung der humanen DZs wurde durch Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff ermöglicht.
- * Subkutan verabreichte humane DZs wandern in die regionalen Lymphknoten. Die Ergebnisse dieser Experimente waren jedoch nur schwach positiv.
- * Migration ist notwendig, wenn erwogen wird, dendritische Zellen im Rahmen einer Tumorthherapie einzusetzen. Diese Arbeit zeigt, daß das xenogene Mausmodell grundsätzlich zum Studium des Wanderungsverhaltens humaner dendritischer Zellen geeignet ist.

Summary:

Dendritic cells are a system of antigen presenting cells, that function to initiate several immune responses such as the sensitization of MHC-restricted T-cells, the rejection of organ transplants, and the formation of T-dependent antibodies. Dendritic cells are found in many nonlymphoid tissues but can migrate via the afferent lymph or the blood stream to the T-dependent areas of lymphoid organs.

Dendritic cell function can be considered in three parts:

- I. Sentinel function - processing and presentation of antigen
- II. Migratory function - the binding of antigen-specific T-cells
- III. Adjuvant function - T-cell activation

In the present study I intended to investigate the role of interleukin-12 (IL-12) in the adjuvant function of DCs and the migration patterns of human dendritic cells in the mouse.

A. IL-12 is a central cytokine with immunoregulatory functions that acts as well in the innate resistance as in the antigen-specific adaptive immunity. Dendritic cells produce IL-12 upon interaction with CD4+ T-cells. The point in question is how this IL-12 production is induced and upregulated.

- * Human dendritic cells produce IL-12 upon the ligation of the CD40 molecule.
- * Human dendritic cells produce IL-12 upon the stimulation with bacterial antigen.
- * Immature human dendritic cells can be stimulated more effectively than mature DCs.

B. Migration is necessary to make the contact between dendritic cells and T-cells possible. The point of question is whether the xenogene mouse can act as a model for studying the migration of human dendritic cells.

- * Intravenously applied human DCs can be found again in the spleen. The cells have been marked with a fluorescent cell linker kit.
- * Subcutaneously applied human DCs can be found again in the regional lymph nodes. Unfortunately the results of these experiments were only weakly positive.
- * In principle the mouse is an appropriate model for studying the migration of human DCs.

V. LITERATURVERZEICHNIS

1. Steinman RM, Schuler G, Romani N, Kaplan G (1988) Dendritic cells. *Book: Atlas of Blood cells - Function and Pathology, Vol 1 p: 361*
2. Steinman RM (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenity. *Annu. Rev. Immunol. 9: 271*
3. Steinman RM, Cohn ZA (1973) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med. 137: 1142*
4. Schuler G, Romani N, Stössel H, Wolff K (1991) Structural organization and biological properties of epidermal Langerhans cells. In *Schuler G (ed) Epidermal Langerhans cells. CRC Press, Boca Raton, pp 87-137*
5. Germain RN (1991) Antigen presentation. The second class story. *Nature 353:605*
6. Freudenthal PS, Steinman RM (1990) The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method. *Proc. Natl. Sci. USA 87: 7698*
7. Romani N, Schuler G, Fritsch P (1991) Identification and phenotype of epidermal Langerhans cells. In: *Schuler G (ed) Epidermal Langerhans cells. CRC Press, Boca Raton, pp 49-86*
8. Stingl G, Shevach EM (1991) Langerhans cells as antigen presenting cells. In: *Schuler G (ed) Epidermal Langerhans cells. CRC Press, Boca Raton, pp 159-190*
9. Romani N, Witmer-Pack M, Crowley M, Koide S, Schuler G, Inaba K, Steinman RM (1991) Langerhans cells as immature dendritic cells. In: *Schuler G (ed) Epidermal Langerhans cells. CRC Press, Boca Raton, pp 191-216*
10. Breathnach SM (1991) Origin, cell lineage, ontogeny, tissue distribution and kinetics of Langerhans cells. In: *Schuler G (ed) Epidermal Langerhans cells CRC Press, Boca Raton, pp 23-47*
11. Lenz A, Heine M, Schuler G, Romani N (1993) Human and murin dermis contain dendritic cells. *J Clin Invest 92: 2587*
12. Wolff K (1991) The fascinating story that began in 1868. In: *Schuler G (ed) Epidermal Langerhans cells. CRC Press, Boca Raton, pp 1-21*
13. Wiedmann A (1964) Über die Struktur des neurovegetativen Systems. *Hautarzt 15: 13*
14. Birbeck MS, Breathnach AS and Everall JD (1961) An electron microscopic study of basal melanocytes and high level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo. *J Invest Dermatol 37: 51*
15. Katz SI, Tamaki K and Sachs DH (1979) Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature 282: 324*
16. Frelinger JG, Hood L, Hill S and Frelinger JA (1979) Mouse epidermal Ia molecules have a bone marrow origin. *Nature 282: 321*
17. Köhler G, Milstein C (1975) Continued cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature 256: 49*

18. Silberberg I, Barr RL, Rosenthal SA (1976) The rate of Langerhans cells in allergic contact hypersensitivity. A review of findings in man and guinea pigs. *J. Invest. Dermatol* 66: 210
19. Wolff K (1972) The Langerhans cell. *Curr. Probl. Dermatol.* 4: 79
20. Stingl G, Katz SI, Clements L, Green I, Shevach EM (1978) Immunologic functions of Ia-bearing epidermal Langerhans cells. *J. Immunol* 121: 2005
21. Hart DNJ, Fabre JW (1981) Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissue of rat heart and other tissues, but not brain. *J. Exp. Med.* 154: 347-361
22. Prickett TCR, McKenzie JL, Hart DNJ (1988) Characterization of interstitial dendritic cells in human liver, *Transplantation* 46: 754-761
23. Hart DNJ, McKenzie JL (1990) Interstitial dendritic cells. *Int. Rev. Immunol.* 6: 128-149
24. Larsen CP, Morris PJ, Austyn JM (1990) Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens: a novel pathway for initiation of rejection. *J. Exp. Med.* 171: 307-314
25. Faustmann D, Steinmann RM, Gebel H, Hauptfeld V, Davie J, Lacy P (1984) Prevention of rejection of murine islet allografts by pretreatment with anti-dendritic cell antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 3864
26. Austyn JM, Kupiec-Weglinski JW, Hankins DF, Morris PJ (1988) Migration patterns of dendritic cells in the mouse. Homing to T-dependent cell areas of spleen, and binding within marginal zone. *J. Exp. Med.* 167: 646-651
27. Crowley MT, Inaba K, Witmer-Pack MD, Gezelter S, Steinman RM, (1990) Use of the fluorescence activated cell sorter to enrich dendritic cells from mouse spleen. *J. Immunol. Methods.*
28. Kraal G, Breel M, Janse M, Bruin G (1986) Langerhans cells, veiled cells and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 163: 981-997
29. Metlay JP, Witmer-Pack MD, Agger R, Crowley MT, Lawless D, Steinman RM (1990). The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* 171: 1753-1772
30. Agger R, Crowley MT, Witmer-Pack MD (1990). The surface of dendritic cells in the mouse as studied with monoclonal antibodies. *Int. Rev. Immunol.* 6: 89-101
31. Witmer-Pack MD, Steinman RM (1984) The anatomy of peripheral lymphoid organs with emphasis on accessory cells: Light microscopic, immunocytochemical studies of mouse spleen, lymph node and Peyer's patch. *Am. J. Anat.* 170: 465
32. Agger R, Witmer-Pack MD, Romani N, Stössel H, Swiggard WJ, Metlay JP, et al (1992) Two populations of splenic dendritic cells detected with M342, a new monoclonal antibody to an intracellular antigen of interdigitating dendritic cells and some B-lymphocytes. *J. Leukocyte Biol* 52: 34

33. Bujdoso R, Hopkins J, Dutia BM, Young P, McConnell (1989) Characterization of sheep afferent lymph dendritic cells and their role in antigen carriage. *J. Exp. Med.* 170: 1285
34. Pugh CW, Mac Pherson GG, Steer HW (1983) Characterization of non-lymphoid cells derived from rat peripheral lymph. *J. Exp. Med.* 157: 1758
35. Knight SC (1984) Veiled cells - "dendritic cells" of the peripheral lymph. *Immunobiology* 168: 349
36. Thorbecke GJ, Silberberg-Sinakin I, Flotte TJ (1980) Langerhans cells as macrophages in skin and lymphoid organs. *J. Invest. Dermatol* 75: 32
37. Wolff K, Schreiner E (1970) Uptake, intracellular transport and degradation of exogenous protein by Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.* 54: 37-52
38. Schuler G, Steinman RM (1985) Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J. Exp. Med.* 161: 526
39. Witmer-Pack MD, Valinsky J, Olivier W, Steinman RM (1988) Quantitation of surface antigens on cultured murine epidermal Langerhans cells: Rapid and selective increase in the level of surface MHC products. *J. Invest. Dermatol* 90: 387
40. Romani N, Lenz A, Glassl H, Stössel H, Stanzl U, Majdic O, Fritsch P, Schuler G (1989) cultured human Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotype and function. *J. Invest. Dermatol.* 93: 600
41. Shimada S, Caughman SW, Sharrow SO, Stephany D, Katz SI (1987) Enhanced antigen-presenting capacity of cultured Langerhans cells is associated with markedly increased expression of Ia antigen. *J Immunol* 139: 2551
42. Teunissen MBM, Wormmeester J, Krieg SR, Peters PJ, Vogels IMC, Kapsenberg ML, Bos JD (1990) Human epidermal Langerhans cells undergo profound morphological changes during in vitro culture. *J Invest Dermatol.* 94: 166
43. Tang A, Udey MC (1991) Inhibition of epidermal Langerhans cell function by low-dose ultraviolet B radiation. Ultraviolet B radiation selectively modulates ICAM-1 (CD45) expression by murine Langerhans cells. *J Immunol.* 146: 3347
44. Inaba K, Schuler G, Witmer MD, Valinsky J, Atassi B, Steinman RM (1986) The immunologic properties of purified Langerhans cells: distinct requirements for the stimulation of unprimed and sensitized T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 164: 605
45. Inaba K, Romani N, Steinman RM (1989) An antigen-independent contact mechanism as an early step in T-cell proliferative responses to dendritic cells. *J. Exp. Med.* 170: 527
46. Pure E, Inaba K, Crowley MT, Tardelli L, Witmer-Pack MD, Ruberti G, Fathman CG, Steinman RM (1990). Antigen processing by epidermal Langerhans cells correlates with the level of biosynthesis of MHC class II molecules and expression of invariant chain. *J. Exp. Med.* 172: 1459
47. Romani N, Koide S, Crowley M, Witmer-Pack M, Livingstone AM, Fathman CG, Inaba K, Steinman RM (1989) Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T-cell clones: intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells. *J. Exp. Med.* 169: 1169

48. Steilein JW, Grammer SF, Yoshikawa T, Demidem A, Vermeer M (1990) Functional dichotomy between Langerhans cells that present antigen to naive and to memory/effector T lymphocytes. *Immunol Rev* 117: 159
49. Austyn JM (1989) Migration patterns of dendritic leukocytes. *Res. Immunol.* 140: 898-902
50. Cumberbatch M, Kimber I (1992) Dermal tumor necrosis factor alpha induces dendritic cell migration to draining lymph nodes, and possibly provides one stimulus for Langerhans cell migration. *Immunology* 75: 257-263
51. Vermeer M, Streilein JW (1990) Ultraviolet B light-induced alterations in epidermal Langerhans cells are mediated in part by tumor necrosis factor alpha. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 7: 258-265
52. Nylander-Lundquist E, Bäck O (1990) Interleukin 1 decreases the number of Ia positive epidermal dendritic cells but increases their expression of Ia antigen. *Acta. Dermatol. Venerol.* 70: 391-394
53. Brodsky FM, Guargliardi LE (1991) The cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol* 9: 707
54. Neefjes JJ, Momburg F (1993) Cell biology of antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 5: 27
55. Inaba K, Inaba N, Naito M, Steinman RM (1993) Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J. Exp. Med.* 178: 479-488
56. Stössel H, Koch F, Kämpgen E, Stöger P, Lenz A, Heufler C, Romani N, Schuler G (1990) Disappearance of certain acidic organelles (endosomes and Langerhans cell granules) accompanies loss of antigen processing capacity upon culture of epidermal Langerhans cells. *J. Exp. Med.* 172: 1471-1482
57. Kleijmeer MJ, Oorschot VMJ, Geuze HJ (1994) Human resident Langerhans cells display a lysosomal compartment enriched in MHC class II. *J. Invest. Dermatol.* 103: 516-523
58. Koch F, Trockenbacher B, Kämpgen E, Grauer O, Stössel H, Livingstone AM, Schuler G, Romani N (1995) Antigen processing in populations of mature dendritic cells is caused by subsets of incompletely matured cells. *J. Immunol.* 155: 93-100
59. Becker D, Reske-Kunz AB, Knop J, Reske K (1991) Biochemical properties of MHC class II molecules endogenously synthesized and expressed by mouse Langerhans cells. *Eur. J. Immunol.* 21: 1213
60. Aiba S, Katz SJ (1990) Phenotypic and functional characteristics of in vivo activated Langerhans cells. *J. Immunol.* 145: 2791
61. Hauser C (1990) Cultured epidermal Langerhans cells activate effector cells for contact sensitivity. *J. Invest. Dermatol.* 95: 436
62. Toews GB, Bergstresser PR, Tigelaar RE, Streilein JW (1980) Epidermal Langerhans cell density determines whether contact hypersensitivity or unresponsiveness follows skin painting with DNFB. *J. Immunol.* 124: 445

63. Romagnoli P, Labhardt AM, Sinigaglia F (1991) selective interaction of Ni with an MHC bound peptide. *EMBO J* 10: 1303
64. Steinman RM, Nogueira N, Witmer MD, Tydings JD, Mellman IS (1980) Lymphokine enhances the expression and synthesis of Ia antigen on cultured mouse peritoneal macrophages. *J. Exp. Med.* 152: 1248
65. Noelle R, Krammer PH, Ohara J, Uhr JW, Vitetta ES (1984) Increased expression of Ia antigen on resting B cells: an additional role for B-cell growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 6149
66. Crawford RM, Finbloom DS, Ohara J, Paul WE, Meltzer MS (1987) C cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) activates macrophages for increased tumoricidal activity and expression of Ia antigens. *J. Immunol.* 139: 135
67. Pessara U, Momburg F, Koch N (1988) Cooperative effect of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on the induction of class II antigen associated invariant chain expression. *Eur. J. Immunol.* 18: 1719
68. Koch F, Kämpgen E, Trockenbacher B, Heufler C, Stöger N, Romani N, Schuler G (1992) Tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) induces loss of immunogenic peptides from MHC class II molecules and thus interrupts the antigen presenting function of epidermal Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.* 89: 510
69. Streilein JW (1989) Antigen-presenting cells in the induction of contact hypersensitivity in mice: evidence that Langerhans cells are sufficient but not required. *J. Invest. Dermatol.* 93: 443
70. Tse Y, Cooper KD (1990) Cutaneous dermal Ia positive cells are capable of initiating delayed type hypersensitivity responses. *J. Invest. Dermatol.* 94: 267
71. Baker CF, Billingham RE (1968) The role of afferent lymphatics in the rejection of skin homografts. *J. Exp. Med.* 128: 197
72. Frey JR, Wenk P (1957) Experimental studies on the pathogenesis of contact eczema in the guinea pig. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 11: 81
73. Aiba S, Nakagawa S, Ozawa H, Miyake K, Yagita H, Tagami H (1993) Upregulation of alpha-4 integrin on activated Langerhans cells: Analysis of adhesion molecules on Langerhans cells relating to the migration from skin to draining lymph nodes. *J. Invest. Dermatol.* 100: 143
74. Sterry W, Künne N, Weber-Matthiesen K, Brasch J, Mielke V (1991) Cell trafficking in positive and negative patch-test reactions: Demonstration of a stereotypic migration pathway. *J. Invest. Dermatol.* 96: 459
75. Norris P, Poston RN, Thomas DS, Thornhill M, Hawk J, Haskard DO (1991) The expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in experimental cutaneous inflammation: A comparison of ultraviolet B erythema and delayed hypersensitivity. *J. Invest. Dermatol.* 96: 763
76. Goebler M, Gutwald J, Roth J, Meinardus-Hager G, Sorg C (1990) Expression of intercellular adhesion molecule-1 in murine allergic contact dermatitis. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 93: 294

77. Cumberbatch M, Fielding I, Kimber I (1994) Modulation of epidermal Langerhans cell frequency by tumor necrosis factor-alpha. *Immunol.* 81: 395
78. Bergstresser PR, Toews GB, Streilein JW (1980) Natural and perturbed distribution of Langerhans cells: responses to ultraviolet light, heterotopic skin grafting and dinitrofluorobenzene sensitization. *J. Invest. Dermatol.* 75: 73
79. Weinlich G, Sepp N, Koch F, Schuler G, Romani N (1990) Evidence that Langerhans cells rapidly disappear from the epidermis in response to contact sensitizers but not to tolerogens/ nonsensitizers. *Arch. Dermatol. Res.* 281: 556
80. Larsen CP, Steinman RM, Witmer-Pack M, Hankins DF, Morris PJ, Austyn JM (1990) Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *J. Exp. Med.* 172: 1483
81. Okamoto H, Kripke ML (1987) Effector and suppressor circuits of the immune response are activated in vivo by different mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3841
82. Silberberg IR, Baer R, Rosenthal SA (1976) The role of Langerhans cells in allergic contact hypersensitivity. A review of findings in man and guinea pigs. *J. Invest. Dermatol.* 66: 210
83. Romani N, Schuler G, Heufler C, Koch F, Topar G, Kämpgen E (1993) Langerhans cells and cytokines. In: *Epidermal growth factors and cytokines; Luger TA, Schwarz T editors. Manuel Dekker, New York, pp: 345*
84. Enk AH, Katz SI (1992) Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1398
85. Steinman RM, Inaba K (1989) Immunogenicity: role of dendritic cells. *BioEssays* 10: 145
86. Inaba K, Steinman RM (1986) Accessory cell-T lymphocyte interactions: antigen dependent and independent clustering. *J. Exp. Med.* 164: 605
87. Young JW, Koulova L, Soegel SA, Clark EA, Steinman RM, Dupont B (1992) The B7/BB1 antigen provides one of several costimulatory signals for the activation of CD4 positive T-lymphocytes by human blood dendritic cells in vitro. *J. Clin. Invest.* 90: 229
88. Rudensky AY, Preston-Hurlburt P, Hong SC, Barlow A, Janeway CA Jr (1991) Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 353: 622
89. Romani N, Inaba K, Witmer-Pack MD, Crowley M, Pure E, Steinman RM (1989) A small number of anti-CD3 molecules on dendritic cells stimulate DNA synthesis in mouse T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 169: 1153
90. Demotz S, Grey HM, Sette A (1990) The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. *Science* 249: 1028
91. Sauder DN, Dinarello CA, Morhenn VB (1984) Langerhans cell production of interleukin 1. *J. Invest. Dermatol.* 82: 605-607
92. Heufler C, Topar G, Koch F, Trockenbacher B, Kämpgen E, Romani N, Schuler G (1992) Cytokine gene expression in murine epidermal cell suspensions: Interleukin 1b

- and macrophage inflammatory protein 1a are selectively expressed in Langerhans cells but are differentially regulated in culture. *J. Exp. Med.* 176: 1221-1226
93. Heufler C, Koch F, Stanzl U, Topar G, Wysocka M, Trinchieri G, Enk A, Steinman RM, Romani N, Schuler G (1996) Interleukin 12 is produced by dendritic cells and mediates TH1 development as well as Interferon-gamma production by TH1 cells. *Eur. J. Immunol.* (in press)
 94. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy KM, O'Garra A (1995) Dendritic cells produce IL 12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4 positive T cells. *J. Immunol.* 154: 5071-5079
 95. Steinman RM, Young JW (1991) Signals arising from antigen presenting cells. *Current opinion in Immunology* 3: 361
 96. Mueller DL, Jenkins MK, Schwartz RH (1989) Clonal expansion versus functional clonal inactivation: A costimulatory signaling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Ann. Rev. Immunol.* 7: 445
 97. Symington FW, Brady W, Linsley PS (1993) Expression and function of B7/BB1 on human epidermal Langerhans cells. *J. Immunol* 150: 1286
 98. Larsen CP, Ritchie SC, Pearson TC, Linsley PS, Lowry RP (1992) Functional expression of the costimulatory molecule B7/BB1 on murine dendritic cell populations. *J. EXP. MED.* 176: 1215
 99. June CH, Ledbetter JA, Linsley PS, Thompson CP (1990) Role of the CD 28 receptor in T-cell activation. *Immunol Today* 11: 211
 100. Koulova L, Clark EA, Shu G, Dupont B (1991) The CD28 ligand B7/BB1 provides costimulatory signal for alloactivation of CD4 positive T-cells. *J. Exp. Med.* 173: 759
 101. Reiser H, Freeman GJ, Razi-Wolf Z, Gimmi CD, Benacerraf B, Nadler LM (1992) Murine B7 antigen provides an efficient costimulatory signal for activation of murine T-lymphocytes via the T cell receptor/ CD3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 271
 102. Inaba K, Witmer-Pack MD, Inaba M, Hathcock SK, Sakuta H, Azuma M, Yagita H, Okumura K, Linsley PS, Ikehara S, Muramatsu S, Hodes RJ, Steinman RM (1994) The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: Abundant expression on dendritic cells in situ and during the maturation in vitro. *J. Exp. Med.* 180: 1849-1860
 103. Engel P, Gribben JG, Freeman GJ, Zhou LJ, Nozawa Y, Abe M, Nadler LM, Wakasa H, Tedder TF (1994) The B7- 2 (B70) Costimulatory molecule expressed by monocytes and activated B lymphocytes is the CD 86 differentiation antigen. *Blood* 84: 1402-1407
 104. Lanier LL, O'Fallon S, Somoza C, Phillips JH, Linsley PS, Okumura K, Ito D, Azuma M (1995) CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *J. Immunol.* 154: 97-105
 105. Enk AH, Katz SI (1994) Heat-stable antigen is an important costimulatory molecule on epidermal Langerhans cells. *J. Immunol.* 152: 3264-3270.

106. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (1991) Cellular and molecular immunology *W. B. Saunders Company Harcourt Brace Jovanovich, Inc.*
107. Austyn JM, Wood KJ (1994) Principles of cellular and molecular immunology. *Oxford University press*
108. Trinchieri G (1995) Interleukin-12: A proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol. 13: 251-276*
109. Aragane Y, Riemann H, Bhardwaj RS, Schwarz A, Sawada Y, Yamada H, Luger TA, Kubin M, Trinchieri G, Schwarz T (1994) IL-12 is expressed and released by human keratinocytes and epidermoid carcinoma cell lines. *J. Immunol. 153: 5366-5372*
110. Müller G, Saloga J, Germann T, Bellinghausen I, Mohamadzadeh M, Knop J, Enk AH (1995) Identification and induction of human keratinocyte-derived IL-12. *J. Clin. Invest. 94: 1799-1805*
111. Scott P (1993) Initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science 260: 496-497*
112. Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B, Trinchieri G (1989) Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NSKF), a cytokin with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med. 170: 827-846*
113. Sieburth D, Jabs EW, Warrington JA, Li X, Lasota J, LaForgia S, Kelleher K, Huebner K, Wasmuth JJ, Wolf SF (1992) Assignment of genes encoding a unique cytokin (IL-12) composed of two unrelated subunits to chromosomes 3 and 5. *Genomics 14: 59-62*
114. Schoenhaut DS, Chua AO, Wolitzky AG, Quinn PM, Dwyer CM, McComas W, Familletti PC, Gately MK, Gubler U (1992) Cloning and expression of murine IL-12. *J. Immunol. 148: 3433-3440*
115. Gearing DP, Cosman D (1991) Homology of the p40 subunit of natural killer cell stimulatory factor (NSKF) with the extracellular domain of the interleukin-6 receptor. *Cell 66: 9-10*
116. Taga T, Kishimoto T (1993) Cytokine receptors and signal transduction. *FASEB J. 7: 3387-3396*
117. O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, Swiggard WJ, Betjes M, Bhardwaj N, Steinman RM (1994) Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology 82: 487-493*
118. Zhou JJ, Schoenhaut DS, Carvajal DM, Warriar RR, Presky DH, Gately MK, Gubler U (1995) Structure-function analysis of the p35 subunit of mouse interleukin 12. *J. Biol. Chem. 270: 5864-5871*
119. Mattner F, Fischer S, Guckes S, Jin S, Kaulen H, Schmitt E, Rude E, Germann T (1993) The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of interleukin-12 heterodimer. *Eur. J. Immunol. 23: 2202-2208*
120. Wolf SF, Temple PA, Kobayashi M, Young D, Diczig M, Lowe L, Dzialo R, Fitz L, Ferenz C, Hewick RM, Kelleher K, Herrmann SH, Clark SC, Azzoni L, Chan SH, Trinchieri G, Perussia B (1991) Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory

- factor, a heterodimeric cytokine with multiple biological effects on T and natural killer cells. *J. Immunol.* 146: 3074-3081
121. Gubler U, Chua AO, Schoenhaut DS, Dwyer CM, McComas W, Motyka R, Nabavi N, Wolitzky AG, Quinn PM, Familletti PC, Gately MK (1991) Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4143-4147
 122. D'Andrea A, Rengaraju M, Valiante NM, Chehimi J, Kubin M, Aste-Amezaga M, Chan SH, Kobayashi M, Young D, Nickbarg E, Chizzonite R, Wolf SF, Trinchieri G (1992) Production of natural killer cell stimulatory factor (NSKF/IL-12) by peripheral blood mononuclear cells. *J. Exp. Med.* 176: 1387-1398
 123. Wolf S, Seiburth D, Perussia B, Yetz-Adalpe J, D'Andrea A, Trinchieri G (1992) Cell sources of natural killer cell stimulatory factor (NSKF/IL-12) transcripts and subunit expression. *FASEB J.* 6:A1335
 124. D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G (1993) Interleukin-10 inhibits human INF gamma production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/interleukin-12 synthesis in accessory cells. *J. Exp. Med.* 178: 1041-1048
 125. Murphy EE, Terres G, Macatonia SE, Hsieh C, Mattson J, Lanier L, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy K, O'Garra A (1994) B7 and IL-12 cooperate for proliferation and INF gamma production by mouse T helper clones that are unresponsive to B7 costimulation. *J. Exp. Med.* 180: 223-231
 126. Chua AO, Chizzonite R, Desai BB, Truitt TP, Nunes P, Minetti LJ, Warriar RR, Presky DH, Levine SF, Gately MK, Gubler U (1994) Expression cloning of a human IL-12 receptor component. A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp 130. *J. Immunol.* 153: 128-136
 127. Chan SH, Perussia B, Gupta JW, Kobayashi M, Pospisil M, Young HA, Wolf SF, Young D, Clark SC, Trinchieri G (1991) Induction of INF gamma production by NK cell stimulatory factor (NSKF): characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J. Exp. Med.* 173: 869-879
 128. Desai BB, Quinn PM, Wolitzky AG, Mongini PKA, Chizzonite R, Gately MK (1992) The IL-12 receptor. Distribution and regulation of receptor expression. *J. Immunol.* 148: 3125-3132
 129. Stern AS, Podlaski FJ, Hulmes JD, Pan YE, Quinn PM, Wolitzky AG, Familletti PC, Stremlo DL, Truitt T, Chizzonite R, Gately MK (1990) Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6808-6812
 130. Tarkkanen J, Saksela E, Lanier LL (1986) Bacterial activation of human natural killer cells. Characteristics of the activation process and identification of the effector cells. *J. Immunol.* 137: 2428-2433
 131. Bancroft GJ, Schreiber RD, Unanue ER (1991) Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in scid mouse. *Immunol. Rev.* 124: 5-24

132. Kearns RJ, Leu RW (1984) Modulation of natural killer activity in mice following infection with *Listeria monocytogenes*. *Cell Immunol.* 84: 361-371
133. Nakamura K, Okamura H, Wada M, Nagata K, Tamura T (1989) Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production. *Infect. Immun.* 57: 590-595
134. Hercend D, Meuer SC, Reinherz EL, Schlossman SF, Ritz J (1982) Generation of a cloned NK cell line derived from the null cell fraction of human peripheral blood. *J. Immunol.* 129: 1299-1305
135. Reem GH, Cook LA, Henriksen DM, Vilcek J (1982) Gamma interferon induction in human thymocytes activated by lectins and B cell lines. *Infect. Immun.* 37: 216-221
136. Jacobsen SE, Veiby OP, Smeland EB (1993) Cytotoxic lymphocyte maturation factor (interleukin 12) is a synergistic growth factor for hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 178: 413-418
137. Ploemacher RE, van Soest PL, Voorwinden H, Boudewijn A (1993) Interleukin-12 synergizes with interleukin-3 and steel factor to enhance recovery of murine hematopoietic stem cells in liquid culture. *Leukemia* 7: 1381-1388
138. Hirayama F, Katayama N, Neben S, Donaldson D, Nickbarg EB, Clark SC, Ogawa M (1993) Synergistic interaction between interleukin-12 and steel factor in support of proliferation of murine lymphohematopoietic progenitors in culture. *Blood* 83: 92-98
139. Bellone G, Trinchieri G (1994) Dual stimulatory and inhibitory effects of natural killer cell stimulatory factor (NSKF/IL-12) on human hematopoiesis. *J. Immunol.* 153: 930-937
140. Gately MK, Warriar RR, Honasoge S, Carvajal DM, Faherty DA, Connaughton SE, Anderson TD, Sarmiento U, Hubbard BR, Murphy M (1994) Administration of recombinant IL-12 to normal mice enhances cytolytic lymphocyte activity and induces production of INF gamma in vivo. *Int. Immunol.* 6: 157-167
141. Perussia B, Chan S, D'Andrea A, Tsuji K, Santoli D, Pospisil M, Young D, Wolf S, Trinchieri G (1992) Natural killer cell stimulatory factor or IL-12 has differential effects on the proliferation of TCR alpha beta+, TCR gamma delta+ T lymphocytes and NK cells. *J. Immunol.* 149: 3495-3502
142. Aste-Amazaga M, D'Andrea A, Kubin M, Trinchieri G (1994) Cooperation of natural killer cell stimulatory factor/interleukin-12 with other stimuli in the induction of cytokines and cytotoxic cell-associated molecules in human T-cells and NK cells. *Cell. Immunol.* 156: 480-492
143. Kubin M, Kamoun M, Trinchieri G (1994) Interleukin-12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production of human T cells. *J. Exp. Med.* 180: 211-222
144. Naume B, Johnson A, Espevik T, Sundan A (1993) Gene expression and secretion of cytokines and cytokine receptors from highly purified CD56+ natural killer cells stimulated with interleukin-2, interleukin-7 and interleukin-12. *Eur. J. Immunol.* 23: 1831-1838
145. Gazinelli RT, Hieny S, Wynn TA, Wolf S, Sher A (1993) Interleukin-12 is required for the T-lymphocyte independent induction of interferon gamma by an intracellular

- parasite and induces resistance in T-deficient hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6115-6119
146. Chan SH, Kobayashi M, Santoli D, Perussia B, Trinchieri G (1992) Mechanisms of INF-gamma induction by natural killer cell stimulatory factor (NSKF/IL-12): Role of transcription and mRNA stability in the synergistic interaction between NSKF and IL-2. *J. Immunol.* 148: 92-98
 147. Robertson MJ, Soiffer RJ, Wolf SF, Manley TJ, Donahue C, Young D, Herrmann SH, Ritz J (1992) Response of human natural killer (NK) cells to NK stimulatory factor (NSKF): cytolytic activity and proliferation of NK cells are differentially regulated by NSKF. *J. Exp. Med.* 175: 779-788
 148. Chehimi J, Starr S, Frank I, Rengaraju M, Jackson SJ, Llanes C, Kobayashi M, Perussia B, Young D, Nickbarg E, Wolf SF, Trinchieri G (1992) Natural killer cell stimulatory factor (NSKF) increases the cytotoxic activity of NK cells from both healthy donors and HIV-infected patients. *J. Exp. Med.* 175: 789-796
 149. Chemini J, Valiante NM, D'Andrea A, Rengaraju M, Rosado Z, Kobayashi M, Perussia B, Wolf S, Starr SE, Trinchieri G (1993) Enhancing effect of natural killer cell stimulatory factor (NSKF/IL-12) on cell-mediated cytotoxicity against tumor-derived and virus-infected cells. *Eur. J. Immunol.* 23: 1826-1830
 150. Bonnema JD, Rivlin KA, King AT, Schoon RA, Abraham RT, Leibson PJ (1994) Cytokine-enhanced NK cell-mediated cytotoxicity. Positive modulatory effects IL-2 and IL-12 on stimulus-dependent granule exocytosis. *J. Immunol.* 152: 2098-2104
 151. Gately MK, Wolitzky AG, Quinn PM, Chizzonite R (1992) Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12. *Cell Immunol.* 143: 127-142
 152. Bloom ET, Horvath JA (1994) Cellular and molecular mechanisms of the IL-12 increase in allospecific murine cytolytic T cell activity. Implications for the age-related decline in CTL. *J. Immunol.* 152: 4242-4254
 153. Gately MK, Desai BB, Wolitzky AG, Quinn PM, Dwyer CM, Podlaski FJ, Familletti PC, Sinigaglia F, Chizzonite R, Gubler U, Stern AS (1991) Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor). *J. Immunol.* 147: 874-882
 154. Naume B, Gately MK, Desai BB, Sundan A, Espevik T (1993) Synergistic effects of interleukin 4 and interleukin 12 on NK cell proliferation. *Cytokine* 5: 38-46
 155. Hsieh C, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM (1993) Listeria-induced Th1 development in alpha-beta-TCR transgenic CD4+ T cells occurs through macrophage production of IL-12. *Science* 260: 547-549
 156. Seder RA, Gazinelli R, Sher A, Paul WE (1993) IL-12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for INF gamma production and diminishes IL-4 inhibition of such priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10188-10192
 157. Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G, Romagnoli S (1993) Natural killer cell stimulatory factor (NSKF/IL-12) induces Th1-type specific immune responses and inhibits the development of IL-4 producing Th cells. *J. Exp. Med.* 177: 1199-1204

158. Wu CY, Demeure C, Kiniwa M, Gately M, Delespesse G (1993) IL-12 induces the production of interferon-gamma by neonatal human CD4+ cells. *J. Immunol.* 151: 1938-1949
159. O'Garra a, Murphy K (1993) T-cell subsets in autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* 5: 880-886
160. O'Garra A, Murphy K (1994) Role of cytokines in determining T-lymphocyte function. *Curr. Opin. Immunol.* 6: 458-466
161. Paul WE, Seder RA (1994) Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76: 241-251
162. Seder RA et al. (1993) Interleukin-12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin-4 inhibition of such priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10188-10192
163. Seder RA et al. (1992) The presence of interleukin-4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J. Exp. Med.* 176: 1091-1098
164. O'Garra A, Hosken N, Macatonia S, Wenner CA, Murphy K. The role of macrophage- and dendritic cell-derived IL-12 in Th1 phenotype development. *Res. Immunol.* 146:466-470
165. Koch F, Stanzl U, Jenewein P, Janke K, Heufler C, Kämpgen E, Romani N, Schuler G (1996) High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J. Exp. Med.* in press
166. Scheicher C, Mehlig M, Dienes HP, Reske K (1995) Uptake of microparticle-adsorbed protein antigen by bone marrow-derived dendritic cells results in up-regulation of interleukin-1 alpha and interleukin-12 p40/p35 and triggers prolonged, efficient antigen presentation. *Eur. J. Immunol.* 25: 1566
167. Kang KF, Kubin M, Cooper KD, Lessin SR, Trinchieri G, Rook H (1996) IL-12 synthesis by human Langerhans cells. *J. Immunol.* 156: 1402
168. Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, Briere F, Galizzi JP, Van Kooten C, Liu YJ, Rousset F, Saeland S (1994) The CD40 antigen and its ligand. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 881
169. Fanslow WC, Clifford KN, Seaman M, Alderson MR, Spriggs MK, Armitage RJ, Ramsdell F (1994) Recombinant CD40 ligand exerts potent biologic effects on T cells. *J. Immunol.* 152: 4262-4269
170. Cayabyab M, Phillips JH, Lanier LL (1994) CD40 preferentially costimulates activation of CD4+ T lymphocytes. *J. Immunol.* 152: 1523-1531
171. Seder R, Paul W (1994) Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Ann. Rev. Immunol.* 12: 635-673
172. Germann T, Partenheimer A, Rude E (1990) Requirements for the growth of Th1 lymphocyte clones. *Eur. J. Immunol.* 20: 2035-2040

173. Kupiec-Weglinski JW, Austyn JM, Morris PJ (1988) Migration patterns of dendritic cells in the mouse. Traffic from the blood, and T cell-dependent and independent entry to lymphoid tissues. *J. Exp. Med.* 167: 632-645
174. Moll H, Fuchs H, Blank C, Röllinghoff M (1993) Langerhans cells transports *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T-cells. *Eur. J. Immunol.* 23: 1595-1601
175. Macatonia SE, Hsieh CS, Murphy KM, O'Garra A (1993) Dendritic cells and macrophages are required for Th1 development of CD4+ T cells from alpha/beta TCR transgenic mice: IL-12 substitution for macrophages to stimulate INF-gamma production is INF-gamma-dependent. *Int. Immunol.* 5: 1119-1128
176. Koch F, Kämpgen E, Schuler G, Romani N (1992) Effective enrichment of murine epidermal Langerhans cells by a modified (mismatched) panning technique. *J. Invest. Dermatol.* 99: 803-807
177. Zhou LJ, Schwarting R, Smith HM, Tedder TF (1992) 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.* 149: 735-742
178. Romani N, Gruner G, Brang D, Kämpgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G (1994) Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* 180: 83-93
179. Jansen JH, Wientjens GJH, Fibbe WE, Willemze R, Kluin-Nelemans HC (1989) Inhibition of human macrophage colony stimulating factor formation by interleukin 4. *J. Exp. Med.* 170: 577
180. Kämpgen E, Koch N, Koch F, Stöger P, Heufler C, Schuler G, Romani N (1991) Class II major histocompatibility complex molecules of murine dendritic cells: Synthesis, sialylation of invariant chain and antigen processing capacity are down-regulated upon culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3014-3018
181. Tsang M, Weatherbee J (1996) Quantitation of human IL-12 heterodimer and p40. *Immunol. Today* 17: 224A (advertisement)
182. Shu U, Kiniwa M, Wu CY, Maliszewski C, Vezzio N, Hakimi J, Gately M, Delespesse G (1995) Activated T cell induce IL-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. *Eur. J. Immunol.* 25: 1125-1128
183. Romani N, Schuler G (1996) Cultured human dendritic cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 109: 294
184. Bender A, Sapp M, Schuler G, Steinman RM, Bhardwaj N (1996) Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J. Immunol. Methods* (in press)
185. Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G (1996) Generation of mature dendritic cells from human blood: An improved method with special regard to clinical applicability. *J. Immunol. Methods* (in press)

