universität innsbruck
Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Entwicklung und Reifung der dendritischen Zelle aus Vorläufern im peripheren humanen Blut

Ebner, Susanne

1998

urn:nbn:at:at-ubi:2-12572

Univ.-Bibliothek Innsbruck
Dg. 30874

Dissertation

Susanne Ebner

Entwicklung und Reifung der dendritischen Zelle aus Vorläufern im peripheren humanen Blut

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. rer. nat.
an der Leopold-Franzens Universität Innsbruck

UB Innsbruck
+C63529101

vorgelegt von: Mag. rer. nat. Susanne Ebner

im Juni 1998

1. Begutachter:	Prof. Koch (Uni Bonn)
2. Begutachter:	Prof. Gstraunthaler (M.F.)
Promotionsdatum:	14.08.98

(DG30874)

19. Okt. 1998

1998: 10918

Ich danke allen, die zur Entstehung dieser Arbeit direkt und indirekt beigetragen haben.

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.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ. Doz. Dr. Nikolaus Romani für die Vergabe des Themas und die motivierende Betreuung und unkomplizierte und schnelle Korrektur dieser Arbeit.

Frau Daniela Reider und Frau Marion Heuer für die Einweisung im labortechnischen Arbeiten in der Zellkultur. Sie waren mir durch ihre Geduld und ihre Ratschläge eine große Hilfe.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meinen Freunden und Kollegen herzlichst bedanken, die mich während dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die durch finanzielle und moralische Unterstützung mein Studium ermöglicht haben.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG 1

1.1 DAS SYSTEM DER DENDRITISCHEN ZELLEN 1
1.1.1 ENTDECKUNG UND CHARAKTERISIERUNG 1
1.2.1 HERKUNFT UND VORKOMMEN 6
1.2.1 DIE FUNKTION DER DENDRITISCHEN ZELLEN WÄHREND DER IMMUNANTWORT 8
Die Wächterfuntion 8
Die migratorische Funktion 8
Die adjuvante Funktion 9
1.2 DIE REIFUNG DER DENDRITISCHEN ZELLEN 11
1.2.1 DIE REGULATION DER REIFUNG DURCH ZYTOKINE 13

2. FRAGESTELLUNG 14

2.1 ETABLIERUNG UND ANALYSE DER METHODE 14
2.2 ANALYSE DER ENTWICKLUNG UND REIFUNG VON DENDRITISCHEN ZELLEN 14

3. MATERIAL UND METHODEN 15

3.1 MATERIAL 15
3.1.1 KULTURMEDIEN 15
3.1.2 ZYTOKINE UND ANTI-ZYTOKINE 16
3.1.3 ANTIKÖRPER 18
3.2 METHODEN 20
3.2.1 REIFUNGSSTIMULANTIEN 20
3.2.1.1 MCM (Monozyten-konditioniertes Medium) 20
3.2.1.2 Bakterielle Stimulanzien: 20
3.2.2 GEWINNUNG DER DENDRITISCHEN ZELLEN AUS BUFFY-COATS ODER VOLLBLUT 21
3.2.2.1 Immunomagnetische direkte Depletion der Lymphozyten 21
3.2.2.2 Immunomagnetische indirekte Depletion der Lymphozyten 22
3.2.2.3 Entfernen der T-Zellen und der NK-Zellen durch Rosettieren mit Neuraminidase behandelten Schaferythrozyten 22
3.2.2.4 Depletion der Lymphozyten aufgrund ihrer Unfähigkeit zu adhärieren (Adhärenzmethode) 23
3.2.3 KULTUR DER LYMPHOZYTEN-FREIEN PERIPHEREN MONONUKLEÄREN ZELLEN 24
3.2.3.1 Vorbereitungskultur oder "priming culture" 24
3.2.3.2 Reifungskultur oder "differentiation culture" 24
3.2.4 IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNGEN UND IMMUNHISTOCHEMIE 26
3.2.5 ALLOGENE GEMISCHTE LEUKOZYTENREAKTION 27
3.2.6 GEWINNUNG VON T-ZELLEN AUS PERIPHEREM BLUT UND NABELSCHNURBLUT 28
3.2.7 STABILITÄTSTEST 29
3.2.8 ELISA FÜR TNF-α, IL-1β UND IL-12 29
3.2.9 NACHWEIS VON NITRIT 29

4. ERGEBNISSE 29

4.1 VERGLEICHENDE ANALYSEN DER VERSCHIEDENEN ZÜCHTUNGSMETHODEN 29
4.1.1 ADHÄRENZMETHODE IM KULTURSYSTEM MIT FETALEM KÄLBERSERUM (FCS) 29
4.1.1.1 Ausbeute und Anreicherung 29
4.1.1.2 Morphologie und Phänotyp 33
4.1.1.3 T-Zell stimulatorische Funktion 40
4.1.2 ADHÄRENZMETHODE IM KULTURSYSTEM OHNE FETALEM KÄLBERSERUM (FCS) 43
4.1.2.1 Ausbeute und Anreicherung 43
4.1.2.2 Morphologie und Phänotyp 47
4.1.2.3 T Zell stimulatorische Funktion 49
4.2 ANALYSE DER ENTWICKLUNG UND REIFUNG DER DENDRITISCHEN ZELLEN 50

4.2.1 EINFLUß DER KULTURBEDINGUNGEN WÄHREND DER FRÜHEN KULTURPHASE („PRIMING CULTURE“) 50
4.2.1.1 Ersatz von Interleukin-4 durch Interleukin-13 50
4.2.1.2 Zusatz von unterschiedlichen Zytokinen und Stimulantien 53
4.2.2 INDUKTION DER REIFUNG WÄHREND DER SPÄTEN KULTURPHASE („DIFFERENTIATION CULTURE“) 55
4.2.2.1 Bakterielle Stimuli 58
4.2.2.2 Definierte Cocktails verschiedener Zytokine 60
4.2.2.3 Monozyten-konditioniertes Medium (MCM) als natürlicher Zytokincocktail 62
Monozyten-konditioniertes Medium (MCM) induziert optimale Reifung 62
Kritische Parameter – „MCM ist nicht MCM“ 65
Einfluß von Immunglobulin – Vergleich verschiedener Immunglobuline 65
Einfluß des Immunglobulins – Etablierung einer Modifikation mit autologem Ig 68
Einfluß der Prostaglandine 70
Analyse der Zusammensetzung des Monozyten-konditionieren Mediums 71
4.2.2.4 TNF-α als Reifungsstimulus im Vergleich mit Monozyten-konditioniertem Medium 73
Untersuchungen im Kultursystem mit fetalem Kälberserum (FCS) 73
Konzentrationsabhängigkeit der TNF-α -induzierten Reifung 73
Morphologischer Vergleich 74
Phänotypischer Vergleich 75
Funktioneller Vergleich 76
Vergleich der Stabilität des Reifungszustands 77
Bestimmung der Spezifität der TNF-α Wirkung mittels neutralisierender Antikörper 78
Wirkt TNF-α direkt oder durch Induktion anderer Zytokinen 84
Untersuchungen im Kultursystem ohne fetalem Kälberserum (FCS) 86
Phänotypischer Vergleich 86
Funktioneller Vergleich 87
Vergleich der Stabilität des Reifungszustands 89
Bestimmung der Spezifität der TNF-α Wirkung mittels neutralisierender Antikörper 90

5. DISKUSSION 91

5.1 ANALYSE DER ADHÄRENZMETHODE 91
5.1.1 AUSBEUTE UND ANREICHERUNG 92
5.1.2 DAS REIFUNGS-PHÄNOMEN 93
5.2.1 MCM IM AUTOLOGEN SYSTEM 94
5.2 ENTWICKLUNG UND REIFUNG DER DENDRITISCHEN ZELLEN 95
5.2.1 EINFLUß DER KULTURBEDINGUNGEN WÄHREND DER FRÜHEN KULTURPHASE 95
5.2.1.1 Ist IL-4 durch IL-13 austauschbar? 95
5.2.1.2 Zusatz von unterschiedlichen Zytokinen in der „priming culture“ induzieren keine Reifung 96
Zugabe von SCF (c-kit) und TNF-α am Tag 0 96
Zugabe von unterschiedlichen Zytokinen 98
5.2.2 INDUKTION DER REIFUNG WÄHREND DER DIFFERENTIATION CULTURE 100
5.2.2.1 Bakterielle Stimuli 100
5.2.2.2 Zytokincocktails in der „differentiation culture“ 103
5.2.3 MONOZYTEN-KONDITIONIERTES MEDIUM (MCM), EIN NATÜRLICHER ZYTOKINCOCKTAIL 105
5.2.4 KRITISCHE PARAMETER: „MCM IST NICHT MCM“ 105
5.2.5 TNF-α ALS REIFUNGSSTIMULUS IM VERGLEICH MIT MCM 108
5.2.5.1 Unterschiede im Phänotyp 108
5.1.5.2 Unterschiede in der MLR 110
5.2.5.3 Hemmung mit neutralisierenden Antikörpern gegen TNF-α 110
5.2.5.4 Stabilität von in MCM und in TNF-α gereiften Zellen 111
5.3 UNTERSCHIEDLICHE REIFUNGSSTIMULI IN HINBLICK AUF KLINISCHE VERWENDBARKEIT 112

6. ZUSAMMENFASSUNG 114

7. LITERATURVERZEICHNIS 117

8. ANHANG 126

Verwendet Abkürzungen:

APC...	Antigen-präsentierende Zelle
α-TNF...	neutralisierender Antikörper gegen Tumor Nekrosefaktor-α
BSA...	bovines Serumalbumin
CD...	Cluster of differentiation
DC...	dendritische Zelle
d...	Tag
d. h...	das heißt
ELISA...	Enzym-gekoppelter-Immunosorbenttest
Fc-Rezeptor...	Oberflächenrezeptor für das Fc-Fragment der Immunglobuline
FACS...	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FCS...	fötales Kälberserum
FITC...	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC/SSC...	Vorwärts- und Seitwärts- Streulicht beim FACS
GM-CSF...	granulocyte/makrophage colony stimulating factor
HLA...	human leucocyte antigen
h...	Stunde
ICAM...	intrazelluläres Adhäsionsmolekül
IgG...	Immunglobulin G
IL...	Interleukin
INF...	Interferon
LZ...	Langerhanszelle
MAb...	monoklonaler Antikörper
MCM...	Monozyten konditioniertes Medium
MLR...	gemischte Lymphozyten-Reaktion
MHC...	Haupthistokompatibilitätskomplex
Min...	Minuten
NK-Zellen...	Natürliche Killerzellen
PBMC...	peripheral blood mononuclear cells
PBS...	Phosphate buffered saline
PE...	Phytoerythrin
PI...	Propidiumiodid
RT...	Raumtemperatur
SACS...	staphylococcus aureus COWAN strain
[^{3}H]TdR...	Tritium markiertes Thymidin
TNF...	Tumor Nekrosefaktor-α
TT...	Tetanus Toxoid
U...	Unit (s)
Vsnr...	Versuchsnummer
∅...	Durchmesser

Glossar

R10	Kulturmedium bestehend aus RPMI 1640, 10% fetalem Kälberserum 50 µM 2-Mercaptoethanol 20 µg/ml Gentamycin 200 mM L-Glutamin
H10	Kulturmedium bestehend aus RPMI 1640, 10% humanem Serum 50 µM 2-Mercaptoethanol 20 µg/ml Gentamycin 200 mM L-Glutamin
well	Vertiefung der Kulturplatte mit einem Fassungsvermögen von 100µl bis zu mehreren ml. Die Anzahl der Vertiefungen pro Platte schwankt je nach deren Größe zwischen 6 und 96.
Veils	schleierförmige Zytoplamaausstülpungen der reifen dendritischen Zellen
Cluster	Zellaggregate zwischen T-Zellen und reifen dendritischen Zellen
Bead	Uniforme, magnetisierbare Polystyrenkörperchen, die mit primären bzw. sekundären monoklonalen Antikörpern beschichtet sind.
Buffy coat	Schicht aus Leukozyten und Thrombozyten zwischen Plasma und (sedimentierten) Erythrozyten, z.B. in einer frischen Vollblutkonserve; bildet sich nach längerem Stehenlassen oder Zentrifugieren von ungerinnbar gemachtem Blut.

1. Einleitung

1.1. Das System der dendritischen Zellen

1.1.1 Entdeckung und Charakterisierung

Dendritische Zellen wurden erstmals 1973 von Steinman und Cohn aus Mäusemilzen isoliert (Steinman und Cohn, 1973). Anfänglich wurden sie als spezialisierte Makrophagen angesehen und verdanken ihren Namen ihrer charakteristischen Morphologie. Besonders ausgeprägt ist dieses dendritische Erscheinungsbild bei den Langerhanszellen, den dendritischen Zellen der Haut.

Die Identifikation der dendritischen Zellen erfolgt durch eine Kombination von

- morphologischen (Steinman und Cohn, 1973; Schuler et al., 1991)
- phänotypischen (Freudenthal und Steinman, 1990; Romani et al., 1991) und
- funktionellen (Steinman, 1991; Stingl und Shevach, 1991, Banchereau und Steinman, 1998) Merkmalen.

Gewebeständige dendritische Zellen zeigen Fortsätze mit rundem Querschnitt, die Zellorganellen beinhaltet. In Kultur ist das Verhalten und die Morphologie dendritischer Zellen einzigartig. Ihre segelartigen Zytoplasmaausstülpungen (die sogenannten „veils") verleihen ihnen ein sonnenartiges Aussehen (Abb.1). Diese Ausläufer enthalten keine Zellorganellen und werden ständig ausgestülpt und wieder retrahiert.

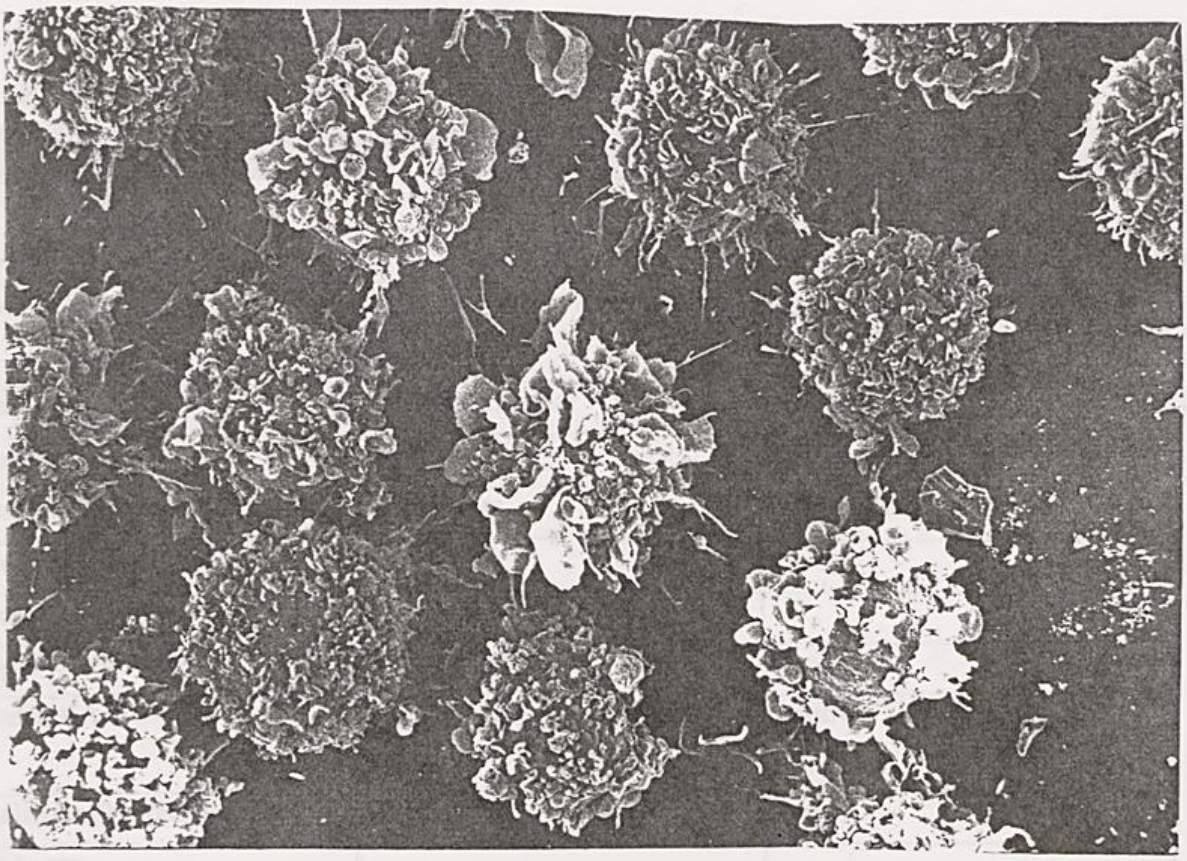


Abb.1: Rasterelektronische Aufnahme von unreifen und reifen dendritischen Zellen aus dem peripheren Blut. (Fotographie von Dr. K. Pfaller, Institut für Histologie, Universität Innsbruck)

Typische Makrophagenmarker wie unspezifische Esterase, Oberflächen-ATPase, CD14, F4/80 Makrophagenmarker werden nicht oder nur sehr schwach auf dendritischen Zellen exprimiert. Dieses Markerprofil weist auf die speziellen immunologischen Aufgaben der dendritischen Zellen hin und unterscheidet sie weitgehend vom Monozyten/Makrophagen-System (Tab.1).

Dendritische Zellen sind die einzigen Zellen, die die Fähigkeit besitzen, naive T-Zellen, d. h. bisher nie mit Antigen in Berührung gelangte T-Zellen, zu aktivieren. Nur sie sind in der Lage, eine primäre Immunantwort auszulösen. Durch diese wichtige Eigenschaft unterscheiden sich die dendritischen Zellen von andern Antigen-präsentierenden Zellen wie Makrophagen und B-Zellen, die als Prototyp der Antigen-präsentierenden Zellen angesehen wurden und von humanen venulären Endothelzellen, die in bestimmten Situationen ebenfalls als Antigen-präsentierenden Zellen dienen können. Diese Zellen können nur bereits sensiblisierte T-Zellen aktivieren und spielen so in der primären Immunantwort keine Rolle.

Tab.1: Vergleiche zwischen dendritischen Zellen und Makrophagen. Modifiziert aus: Principles of Cellular and Molecular Immunology, Austyn JM, Wood KJ

Vergleiche zwischen dendritischen Zellen und Makrophagen		
Eigenschaften	**Dendritische Zellen**	**Makrophagen**
Cytologie		
Form	aktive Formation von Dendriten, sog. „veils“	sessil, rund, „spiegeleierförmig“
Kern	oval oder irregulär	nierenförmig
Mitochondrien	rund	filamentös
Endoplasmat. Retikulum	mehr glattes	mehr rauhes
Endosomen, Lysosomen	wenige	viele
Cytochemie		
Unspezifische Esterase	schwach positiv oder negativ	positiv
Membran-ATPase	negativ (im unreifen Zustand positiv)	positiv
Alkalische Phosphatase	negativ	positiv
Adhärenz		
In Kultur	schwach oder fehlend	stark
Endozytose		
Phagozytose	schwach oder nicht phagozytisch	aktiv-phagozytisch
Pinozytose	sehr aktiv (Makropinozytose)	aktiv
Membranproteine		
Zellinien-spezifisch	33D1; NLDC145/DEC-205; N418/CD11c	F4/80, CD14
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)

Man muß jedoch beachten, daß die angegebenen Eigenschaften der dendritischen Zellen in Abhängigkeit ihres Reifungsgrades variieren, zum Beispiel 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, (siehe Kapitel „Die Reifung der dendritischen Zellen“).

Dendritische Zellen exprimieren eine große Anzahl von MHC Klasse I Molekülen und konstitutiv MHC Klasse II Moleküle auf ihrer Zelloberfläche. Genauso werden verschiedene Adhäsionsmoleküle wie z. B. ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1, CD54), LFA-3 (Leukocyte-function-associated antigen-3, CD58) und PECAM-1 (CD31) exprimiert. Weiters werden Moleküle mit kostimulatorischer Funktion bei der T-Zellaktivierung exprimiert, wie B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86). In Tab.2 sind charakteristische Marker von unkultivierten dendritischen Zellen aus dem Blut sowie von unreifen und reifen dendritische Zellen, gewonnen aus Monozyten aus dem peripherem Blut, im Vergleich mit Makrophagen und aktivierten B-Lymphozyten aufgezeigt.

Tab.2: Einige charakteristische Antigene, die die Differenzierung von humanen dendritischen Zellen beschreiben; hier im Vergleich mit Makrophagen und aktivierten B-Zellen. Beurteilung der Expression der Antikörper erfolgte nach folgendem Schlüssel: -, negativ; ±, variabel; +, positiv; ++, stark positiv; +++, extrem stark; ( ) nur eine positive Subpopulation. Na = not available. * = über Nacht oder länger in Gegenwart von Serum kultiviert, §= bis jetzt erst Daten aus der Maus. Modifiziert nach D. N. J. Hart, 1997.

Antigen/Molekül	Frisch isolierte Blut-DCs, unreife DCs	Reife DCs aus dem Blut	Unreife DCs aus Monozyten des Bluts	Reife DCs aus Monozyten des Bluts	Makro-phagen	Aktivierte B-Zellen
Dendritische Zellen						
CMRF-44	(+)	+++	±	++	(+)	++
CMRF-54	-	++	-	++	(+)	(+)
CD83	-	+	-	++	-	(+
DEC-205§	Na	++	Na	Na	±	±
S100	Na	++	±	+	Na	-
Makrophagen						
CD14	-	-	±	-	+	±
CD68	+	+	+++	++	++	-
CD115	-	-	++	-	+	-
Myeloide/lympoide						
CD1	-	-	-	++	(+)	-
CD4	+	±	+	+	+	-
CD5	+	++	+	++	+	(+)
CD13	+	+	+	+	+-	
CD33	+	+	+	+	±	-
Fc-Rezeptoren						
CD64	±	-	++	±	++	-
CD32	+	±	++	±	++	+
CD16	-	-	(+)	-	+	-
Adhäsionsmoleküle						
CD11a (LFA-1)	++	++	++	++	+	++
CD11b	-	(+)	++	++	+	-
CD11c	±	++	+	+	+	(+)
ICAM-1 (CD54)	+	+++	+	+++	+	+++
ICAM-2 (CD50)	+	+	+	+		
ICAM-3 (CD 102)	+++	+++	+	+	-	+
LFA-3 (CD58)	++	++	++	++	++	++
Kostimulatorische						
CD40	±	++	+	++	+	++
CD80	-	++	-	++	+	++
CD86	-	++	±	+++	+	++
Leukozytenmoleküle						
CD45RA	+	±	+	±	-	-
CD45RO	-	++	-	++	+	++
MHC						
HLA-ABC	++	+++	+	+++	++	++
HLA-DP	+	+++	+	+++	++	++
HLA-DQ	++	+++	+	+++	++	++
HLA-DR	++	+++	+	+++	++	++

1.2.1 Herkunft und Vorkommen

Es gibt zwei Typen von dendritischen Zellen, die verschiedene Eigenschaften und Funktionen haben. Die interdigitierenden dendritischen Zellen, meist einfach nur „dendritische Zellen" genannt, stammen direkt von Knochenmarksvorläufern ab und haben gemeinsame Vorläufer mit Monozyten/Makrophagen und Granulozyten (Abb.2). Ein weiterer Entwicklungsweg über eine vorlaäuferzelle, die sowohl T-Zellen, als auch dendritische Zellen hervorbringen kann, wurde kürzlich beschrieben. Den zweiten Typ von dendritischen Zellen nennt man follikuläre dendritische Zellen, weil sie in den Keimzentren der Lymphfollikel in den Lymphknoten, der Milz und dem Mukosa-assoziierten Lymphgeweben vorkommen. Follikuläre dendritische Zellen stammen nicht direkt vom Knochenmark-Zellvorläufern ab und sind nicht mit den interdigitierenden dendritischen Zellen verwandt.

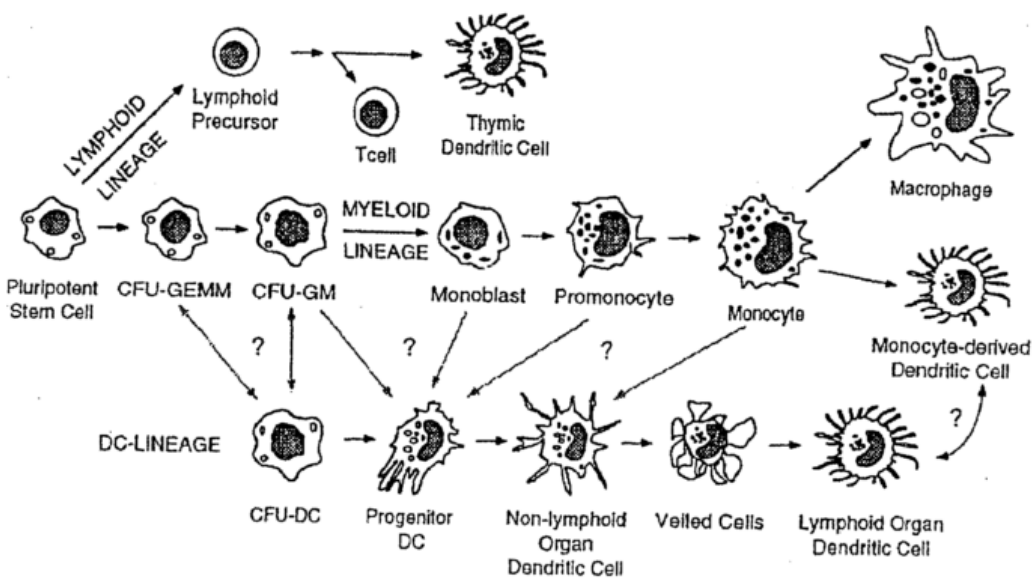


Abb.2: Mögliche Abstammung und Entwicklung von dendritischen Zellen. Aus Lutz et al., 1996.

Seit ihrer erstmaligen Beschreibung wurden dendritische Zellen in beinahe allen Geweben gefunden, wobei sie je nach Lokalisation unterschiedliche Phänotypen haben und verschiedene Funktionen erfüllen.

Tab.2: Vorkommen der dendritischen Zellen im Gewebe

Kompartiment	Nomenklatur	Lokalisation
nicht-lymphatische Organe	Langerhanszellen	Epidermis, Schleimhäute
	Dermale dendritische Zellen	Dermis
	Interstitielle dendritische Zellen	Herz, Lunge, Niere, Leber, Darm
Zirkulation	DC der afferenten Lymphe „veiled cells“	afferente Lymphe
	Blut-dendritische Zellen	peripheres Blut
Lymphatische Organe	interdigitierende Zellen	T-Zell-Areale der sekundären lymphatischen Gewebe (Lymphknoten, Tonsillen, Peyer´sche Plaques), Medulla des Thymus
	dendritische Zellen	marginale Zone der Milz

1.2.1 Die Funktion der dendritischen Zellen während der Immunantwort

Die Aufgaben und Fähigkeiten der dendritischen Zellen sind vielfältig. Sie sind die wichtigsten Induktoren der Immunabwehr, da sie als einziger Zelltyp in der Lage sind, naive T-Zellen zu stimulieren. Die drei verschiedenen Funktionsbereiche sind auch zeitlich getrennt (Steinman, 1991, Banchereau und Steinman, 1998).

Die Wächterfunktion

Unreife dendritische Zellen aus den nicht-lymphatischen Geweben sind aufgrund ihrer Fähigkeiten zur Endozytose in der Lage, fremde Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und zu präsentieren. Durch Makropinozytose und Rezeptor-vermittelte Aufnahme (Sallusto et al., 1995) können Moleküle und durch Phagozytose können ganze Mikroorganismen (Austyn, 1996) von den Zellen aufgenommen werden. 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 (Kleijmeer et al., 1994, Pieters, 1997). Diese Annahme wird bestärkt von der Tatsache, daß mit Abnahme der Endosomen im Zuge der Reifung die Prozessierungspotenz der LCs rückläufig ist (Stössel et al., 1990). In umgekehrter Weise verhält sich die Syntheserate der MHC-II-Moleküle (Puré et al., 1990; Kämpgen et al., 1991; Cella et al., 1997).

Die prozessierten Peptide werden nach der Koppelung an MHC-Moleküle an der Zelloberfläche T-Lymphozyten präsentiert.

Die migratorische Funktion

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

Die mit Antigen „beladenen" DCs wandern anschließend über die afferenten Lymphgefäße in die parakortikalen T-Zellareale der Lymphknoten, wo sie die T-Zellen auffinden, die spezifisch zu ihnen passen und in der Lage sind, Immunität zu induzieren. Die für die Wanderung benötigten Adhäsionsmoleküle werden de novo oder verstärkt exprimiert und verbessern die Migrationsfähigkeit der Zellen effizient. Im Zuge der Wanderung verlieren die DCs ihre Fähigkeit Antigen zu prozessieren und verstärken ihre

Fähigkeit Antigen zu präsentieren. Die in den Lymphknoten angelangten reifen dendritischen Zellen sind ident mit den interdigitierenden Retikulumzellen.

Die adjuvante Funktion

Die dendritischen Zellen werden als Adjuvans der Natur (Steinman, 1991) bezeichnet, da sie in der Lage sind primäre Immunantworten auszulösen.

Die Migration der DCs in die Lymphknoten ist notwendig, weil nur dort eine realistische Chance besteht, die für die jeweiligen MHC/Peptid-Komplexe spezifischen T-Zellklone zu finden. Sind die T-Zellen stimuliert, proliferieren sie und produzieren Zytokine. Die Aktivierung der passenden T-Zellen erfolgt in drei Schritten (Steinman und Inaba, 1989).

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 (Inaba et al., 1986; Inaba et al., 1989). 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 bekannt. Wahrscheinlich spielt die Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle im Rahmen des Reifungsprozesses der dendritischen Zellen eine Rolle. Das Antigen-unspezifische „clustering" kann nur bei reifen dendritischen Zellen und nicht bei anderen APC beobachtet werden (Feudenthal und Steinman, 1990; Romani et al., 1989; Teunissen et al., 1990; Inaba und Steinman, 1989).
2. Nach erfolgreicher Suche nach dem passenden T-Zellrezeptor erfolgt nun als nächster Schritt die Antigen-**spezifische** DC-T-Zell-Bindung zwischen MHC II/Peptidkomplex und dem spezifischen T-Zell-Rezeptor. Biochemische und molekularbiologische Studien zeigen, daß APCs nur eine geringe Anzahl von streng definierten immunologisch wirksamen Peptiden präsentieren und zusätzlich eine große Zahl Peptide von größerer Variationsbreite (Germain, 1991; Rudensky et al., 1991). Eine APC, insbesonders eine DC 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 das Ausreichen einer geringen Anzahl hin (Romani et al., 1989; Demotz et al., 1990).

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

3. Für die T-Zell-Proliferation sind weiterhin noch **kostimulatorischen** Signale nötig, die von den DCs gebildet werden (Steinman und Young, 1991). Diese Signale sind biochemisch nicht vollständig identifiziert (Mueller et al., 1989). Für das B7-1 (CD80)-Molekül, das auf reifen DCs exprimiert wird (Symington et al., 1993; Young et al., 1992), wurde eine kostimulatorische Funktion nachgewiesen (Koulova et al., 1991; Reiser et al., 1992). Das gilt auch für das B7-2 (CD86)-Molekül (Inaba et al., 1994; Engel et al., 1994; Lanier et al., 1995; Enk und Katz, 1994).

1.2. Die Reifung der dendritischen Zellen

Die Reifung der dendritischen Zellen wurde anfänglich mit epidermalen Langerhanszellen als Modell beschrieben (Schuler und Steinman, 1985). Dieser Reifungsprozess wurde inzwischen auch für andere Typen von DCs beschrieben, z. B. für Blut-dendritische Zellen.

Nachdem sich die dendritischen Zellen aus Vorläufern aus Knochenmark oder Thymus entwickelt haben, wandern die DCs in verschiedene lymphatische und nicht-lymphatische Gewebe und Organe. Dort ruhen sie als **unreife** dendritische Zellen („**early stage**"). Sie werden als unreif bezeichnet, weil sie noch einige Monozyten/Makrophagen-Marker exprimieren, wie z. B. Fc- (CD32) und Komplement-Rezeptor (iC3b, CD11b) (Stingl et al., 1977), F4/80-Makrophagenantigen, Membran-ATPasen, unspezifische Esterasen (Schuler und Steinman, 1985), endogene Peroxidasen und dem Rezeptor für Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF, CD115) (Takashima et al., 1995). Ein weiteres Kennzeichen der DCs ist eine konstitutive Expression von MHC-Klasse II, die im Zuge der Reifung verstärkt wird (Schuler, 1991). Als Beispiele für unreife dendritische Zellen in nicht lymphatischen Geweben sind die Langerhanszellen der Epidermis und der Schleimhäute, die dermalen dendritischen Zellen und die interstitiellen dendritischen Zellen in Herz, Lunge, Niere, Leber und Darm zu nennen.

Als Antwort auf bestimmte Stimuli, wie z. B. Eindringen von Bakterien, Reizung durch Kontaktallergene etc., wird ein Prozess eingeleitet, der dadurch gekennzeichnet ist, daß DCs sehr schnell eine ungeheuer große Kapazität entwickeln, um native Protein-Antigene zu prozessieren (effiziente Antigenaufnahme, massive MHC Biosynthese, Anwesenheit von Prozessier-Organellen, wie MHC-Klasse II beinhaltende Vesikel – MIIC´s (Pierre et al., 1997)). Die DCs sind immer noch unreif aber funktionell sehr aktiv; sie befinden sich in einer Art Zwischenstadium („**intermediate stage**"). Frisch isolierte (z. B. trypsinisierte) epidermale Langerhanszellen sind der Prototyp diese Stadiums.

Die dendritischen Zellen wandern nun via afferente Lymphe ins lymphatische Gewebe. Der Differenzierungsprozess der Zellen geht weiter und führt zu **reifen** dendritischen Zellen („**late stage**") (Abb.3). Diese sind charakterisiert durch geringe Kapazität für Antigenaufnahme und Antigenprozessierung aber durch eine stark erhöhte Funktion, um T-Zellen zu sensibilisieren. Inflammatorische Stimuli, wie die Zytokine TNF-α und IL-1β induzieren die vorher beschriebenen Vorgänge (Kämpgen et al., 1991;

Puré et al., 1990) und den „transient boost" der Biosynthese von MHC-Klasse II Molekülen (Cella et al., 1997). Diese Zytokine sind auch für das Abschalten der Makropinozytose (Sallusto et al., 1995) verantwortlich.

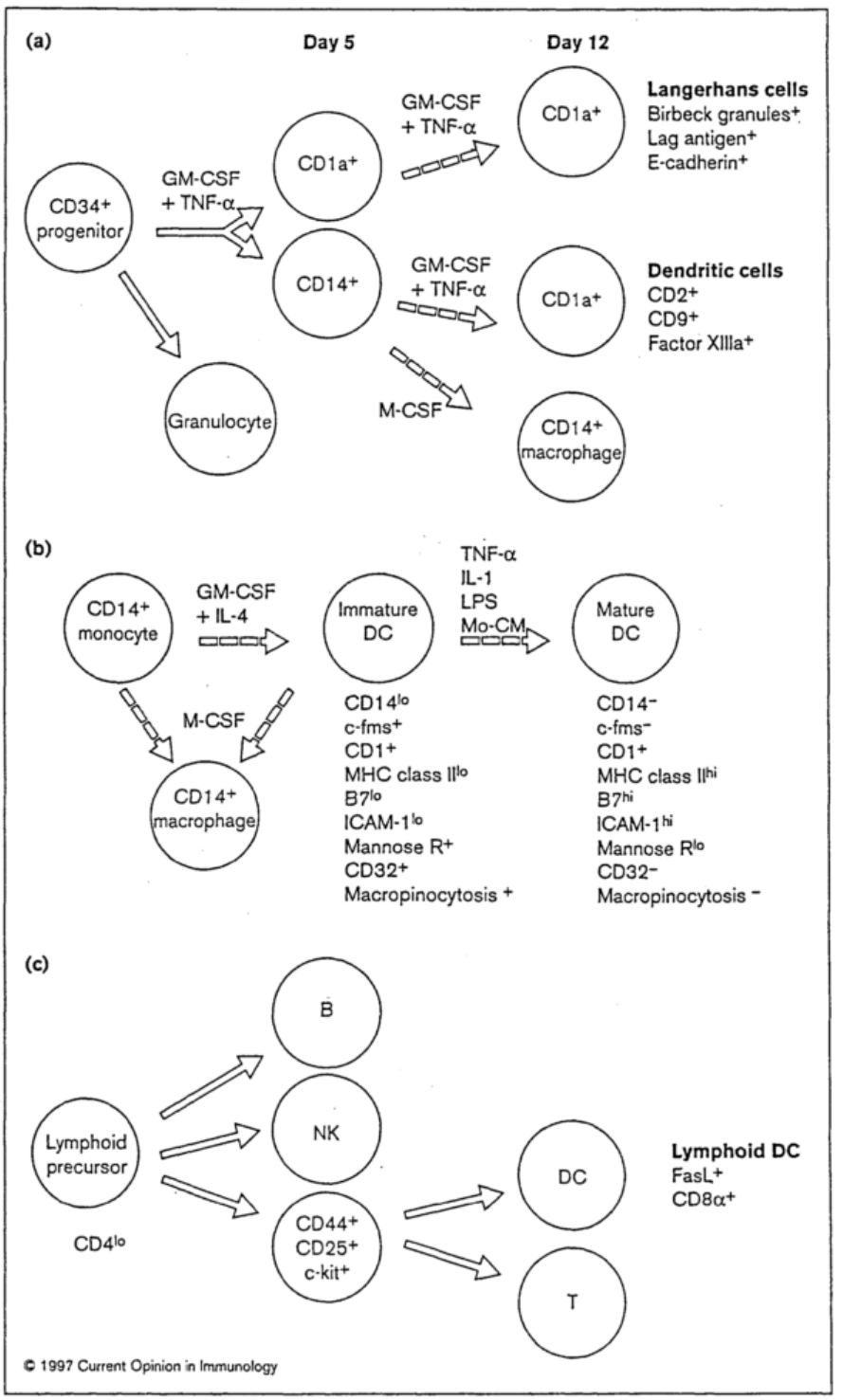


Abb.3: Herkunft und Reifung der dendritischen Zellen. Aus Cella et al., 1997.

1.2.1 Die Regulation der Reifung durch Zytokine

In vivo können die zellulären Quellen der Reifungs-induzierenden Zytokine unterschiedliche Zelltypen sein, die in räumlicher Nähe zu den dendritischen Zellen liegen. Zum Beispiel ist in der Haut bekannt, daß Keratinozyten in Antwort auf ein Gefahrensignal wie kontaktsensibilisierende Applikationen, TNF-α und IL-1β sezernieren. Andererseits wird IL-1β von den dendritischen Zellen selbst gemacht (Enk und Katz, 1992, Heufler et al., 1992). Auch die Phagozytose von Bakterien oder die Aufnahme von bakteriellen Produkten (LPS) löst die Produktion von inflammatorischen Zytokinen in DCs aus wie IL-1β (Henderson et al., 1997; Granucci et al., 1994; Kanangat et al., 1995), TNF-α (Henderson et al., 1997; Thurnher et al., 1997) und IL-6 (Riva et al., 1996). So können DCs, die infiziert wurden oder sich in bakteriell kontaminierten Milieu befinden, autokrin die Reifung auslösen und Immunität induzieren.

Kürzlich wurden zwei Moleküle beschrieben, die eine kritische Rolle bei der Reifung und beim Überleben der dendritischen Zellen spielen. TRANCE (TNF-related activation-induced cytokine) wird von T-Zellen produziert und verhindert eine Apoptose der DCs (Wong et al., 1997). RANK (receptor activator of NF-κB), ein Homolog zum TNF-Rezeptor und CD40 wird auf dendritischen Zellen exprimiert und die Bindung an seinen Liganden (RANKL) steigert die immunostimulatorischen Fähigkeiten für naive T-Zellen (Anderson et al., 1997).

Ein wichtiger Gegenspieler der Reifung von DCs ist IL-10 (De Smedt et al., 1997). Dieses Zytokin verhindert die vermehrte Expression von kostimulatorischen Molekülen auf dendritischen Zellen. Dendritische Zellen, die mit IL-10 inkubiert wurden, induzieren keine Proliferation in $CD4^+$ T-Zellen und TH_1 Klonen sondern Anergie (Steinbrink et al., 1997; Takenaka et al., 1997). Steinbrink et al. (1997) zeigte, daß vollständig ausgereifte DCs auf die Effekte des IL-10 nicht mehr ansprechen. Ein anderes Zytokin das hemmenden Einfluß auf die Reifung der DCs hat, scheint TGF-β zu sein (Yamaguchi et al., 1997).

2. Fragestellung

2.1. Etablierung und Analyse der Methode

Ein wichtiger Punkt in Hinblick auf zukünftige klinische Verwendung der dendritischen Zellen (z. B. Tumortherapie) ist die einfache, effektive und kostengünstige Gewinnung der Zellen. Auch muß die klinische Verwendbarkeit von Medien und Reagenzien gewährleistet sein. Eine optimale derartige Technik existiert noch nicht. Deshalb war es das Ziel dieser Arbeit, eine solche Methode zu etablieren. Dabei ergab sich folgende konkrete Fragestellung:

1. Wie kann man am einfachsten dendritische Zellen in großen Mengen produzieren?
2. Welche Zytokine eignen sich am besten, um große Mengen von unreifen dendritischen Zellen zu produzieren?
3. Wie und wann induziert man am besten die Reifung der dendritischen Zellen und womit?

2.2. Analyse der Entwicklung und Reifung von dendritischen Zellen

Aus der Erkenntnis, daß sowohl Monozyten-konditioniertes Medium als auch Tumornekrosefaktor-α eine Reifung der dendritischen Zellen induzieren, ergaben sich weitere Fragen.

4. Woraus besteht Monozyten-konditioniertes Medium und wie wirkt es?
5. Unterscheidet sich der Wirkungsmechanismus der Reifung, den Monozyten-konditioniertes Medium und Tumornekrosefaktor-α induzieren?
6. Wenn ja, wie?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Kulturmedien

„R10“ beinhaltet 10% hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS, Biological Industries, Kibbuz Beit Haemek, Israel), 50 µM 2-Mercaptoethanol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 20 µg/ml Gentamycin (Bio Whittaker, Walkersville, MD) sowie 200 mM L-Glutamin (Sebak, Stuben, A) in RPMI-1640 (PAA Laboratories GmbH, Linz, A).

"Autologes Medium" beinhaltet 1% autologes Plasma, 50 µM 2-Mercaptoethanol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 20 µg/ml Gentamycin (Bio Whittaker, Walkersville, MD) sowie 200 mM L-Glutamin (Sebak, Stuben, A) in RPMI-1640 (PAA Laboratories GmbH, Linz, A).

„H10“ beinhaltet 10% hitzeinaktiviertes humanes Serum aus einem Pool von fünf Personen, 50 µM 2-Mercaptoethanol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 20 µg/ml Gentamycin (Bio Whittaker, Walkersville, MD) sowie 200 mM L-Glutamin (Sebak, Stuben, A) in RPMI-1640 (PAA Laboratories GmbH, Linz, A).

3.1.2 Zytokine und Anti-Zytokine

GM-CSF (Leukomax "Sandoz", Novartis, Wien, A, spezifische Aktivität 1,1 x 10^6 U/mg).
IL-1α (Hoffmann-La- Roche, Nutley, NJ, spezifische Aktivität 2 x 10^8 U/mg
IL-1β (Genzyme, Cambridge, MA, spezifische Aktivität 5 x 10^8 U/mg)
IL- 2 (Novartis, Wien, A, spezifische Aktivität 1 x 10^7 U/mg)
IL- 4 Rekombinantes humanes IL-4, Immunex Corporation, Seattle, WA, spezifische Aktivität 5 x 10^7 U/mg; rekombinantes IL-4, Genzyme, Boston, MA, spezifische Aktivität 1 x 10^7/ml; rekombinantes humanes IL-4, Novartis, Wien, A; dieses Zytokin wurde uns freundlicherweise von Dr. Ekke Liehl (Novartis Forschungsinstitut, Wien) zur Verfügung gestellt. Die spezifische Aktivität war nicht bekannt und dieses IL-4 wurde in der Kultur in einer Endkonzentration von 50 - 100 ng/ml eingesetzt.

IL-4 produzierende Zellen (Il-4-62): Diese Zellen wurden uns freundlicherweise von Dr. A. Lanzavecchia (Basel Institute of Immunology, Basel, CH) zur Verfügung gestellt. Der Supernatant dieser Zellen wurde in der Kultur zu 5% v/v eingesetzt.

IL- 6 (Genzyme, Boston, MA, spezifische Aktivität 1 x 10^7 U/mg)

IL-10 (DNAX, Palo Alto, CA, spezifische Aktivität 1x 10^7 U/mg). Dieses Enzym wurde freundlicherweise von Dr.A. O´Garra zur Verfügung gestellt.

IL-13 (Pharmingen, San Diego, CA, spezifische Aktivität 1 x 10^6 U/mg)

IL-15 (Genzyme, Cambridge, MA, spezifische Aktivität 1 x 10^7 U/mg)

TNF-α wurde uns freundlicherweise von Dr. G.R. Adolf (Bender, Vienna, A) zur Verfügung gestellt (spezifische Aktivität 6 x 10^7 U/mg).

CD40 Ligand wurde uns freundlicherweise von Dr. P. Lane (Hoffmann-La Roche, Basel, CH) zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um ein chimeres Fusionsprotein zwischen der Maus CD8 α-Kette und dem humanen CD40 Liganden (CD40-L).

Neutralisierende anti-TNF-α Antikörper wurden von den Hybridomzellen (SDW 18.1.1 ATCC, HB 92 98) produziert (Tracey et. al., 1988). Der Supernatant wurde 10% v/v eingesetzt.

Neutralisierende anti-IL-10 Antikörper wurden von den Hybridomzellen (HB10487, HB11676, HB 11677 ATCC, Dr. A. O´Garra) produziert. Der Supernatant wurden zu 10% v/v eingesetzt.

Humanes Gammaglobulin (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA)

Monomeres 7s-IgG (Biochemie GmbH., Wien, A), Endobulin, humanes Immunglobulin zur intravenösen Anwendung (Immuno AG, Wien, A)

3.1.3 Antikörper

Tab.4: primäre Antikörper, die für Flowzytometrie, Immunhistochemie und Zellanreicherung verwendet wurden. Bei Antikörpern ohne explizite Speziesbezeichnung handelt es sich um monoklonale Antikörper aus der Maus.

Antigen	Name/Quelle	Isotyp
Nichtreaktive Kontrollen		
	Pharmingen (g)	IgG1
	DAKO (e)	IgG2a
	DAKO	IgG2b
	Pharmingen	IgM
	Pharmingen	Rat IgG2b
	AFCR-MAC 6 bis 10	Rat IgM
Monozyten		
CD14 [3C10]	TIB 228, ATCC (a)	IgG2b
CD68	EBM11, DAKO	IgG1
Dendritische Zellen		
CD83	HB-15a, T.F. Tedder, (f)	IgG2b
B-Zellen		
CD19	4G7, Becton Dickinson (b)	IgG1
CD20	MEM-97, V. Horejsi, Praha	IgG1
NK-Zellen		
CD56	MY31, Becton Dickinson	IgG1
T-Zellen		
CD2	OKT-11, ATCC	IgG2a
CD3	UCHT1, DAKO	IgG1
CD4	Leu3a+b, Becton Dickinson	IgG1
CD8	Leu2b, Becton Dickinson	IgG2a
MHC		
HLA-A,B,C	W6/32, ATCC	IgG2a
HLA-DR (FITC)	L243, Becton Dickinson	IgG2a
HLA-DR (PE)	L243, Becton Dickinson	IgG2a
HLA-DR/DQ	9.3F10/HB180, ATCC	IgG2a
Adhäsions- und Kostimulatorische Moleküle		
CD80, B7-1	L307.4, Becton Dickinson	IgG1
CD86, B7-2	IT2.2, Pharmingen	IgG2b
CD44v9	VFF16, P. Herrlich (k)	IgG2b
Aktivation		
CD45RA	4G10, R.M. Steinman (d)	IgG2a
CD45RO	UCHL-2, DAKO	IgG2a
CD95 (fas/APO-1)	DX2, Pharmingen	IgG1
Rezeptoren		
CD87/Urokinase-Plasminogen-Aktivator- Rezeptor	VIM-5, W. Knapp (h)	IgM

Antigen	Name/Quelle	Isotyp
CD115/M-CSF-Rezeptor	3-4A4-E4, Oncogene Science (i)	Rat IgG2b
CD116/GM-CSF-Rezeptor, α Kette	2B7-17-A und 3G7-14-15, N.A. Nicola, Melbourne, Aus	IgG2a
CDw120a	Utr-1,TNF-R, Typ 1, 80 kD, M. Brockhaus, Basel	IgG1
CDw120b	Htr-9, TNF-R, Typ 2, 75 kD, M. Brockhaus, Basel	IgG1
CD w121a	6B5, IL-1-R, Typ 1, 80 kD, Pharmingen	IgG2a
Diverses		
CD1a	OKT6, ATCC	IgG1
CD31 (PECAM-1)	JC/70A, DAKO	IgG1
CD34	MY10, Becton Dickinson	IgG1
CLA (cutaneous lymphocyte antigen)	HECA-452, Pharmingen	Rat IgM
CD15s (Sialyl-Lewis-x)	CSLEX, Pharmingen	IgM
Erythrocyten, Erythroblasten	VIE-G4, O. Majdic/W. Knapp, Wien	IgM
E-Cadherin	HECD-1/Takara (j)	IgG1

(a) ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD; (b) Becton Dickinson, Mountain View, CA; (c) Ortho, Raritan, NJ; (d) The Rockefeller University, New York, NY; (e) Roskilde, Denmark; (f) Duke University; Durham NC; (g) San Diego, CA; (h) Vienna, A; (i) Cambridge, MA; (j) Otsu, Japan; (k) Deutsches Krebsforschungszentrum; Heidelberg, D

3.2 Methoden

3.2.1 Reifungsstimulantien

3.2.1.1 MCM (Monozyten-konditioniertes Medium)

Herstellung:

1. Beschichten von Petri-Schalen 100mm x 15mm (Falcon 1029, Becton Dickinson, NJ, USA) mit IgG (100µg/ml in PBS); 1 h Inkubation bei Raumtemperatur;
2. 3-maliges Waschen mit PBS; (die beschichteten Platten wurden meist frisch verwendet, sind allerdings einen Tag auf 4°C haltbar)
3. Zugabe von 50 Millionen PBMC in 10 ml Kulturmedium/Petri-Schale;
4. 1 h Inkubation bei 37°C.
5. 3-maliges Waschen mit PBS. Am Boden der Petri-Schale hat sich ein Monolayer aus Monozyten/Makrophagen gebildet.
6. Zugabe von 10ml Kulturmedium/Petri-Schale. Inkubation für 24 h bei 37°C.
7. Abnahme der Überstände, Abzentrifugation (269 g, 8 min, 4°C) der restlichen Zellen, Aufbewahrung des MCM auf –20°C.
8. Einsatz in der Kultur zu 33% v/v.

3.2.1.2 Bakterielle Stimulanzien:

SACS:

Staphylococcal aureus, COWAN I Stamm (Calbiochem, La Jolla, CA, Endverdünnung: 1:10000

BCG:

Bacillus Calmette-Guérin, Stamm von Mycobacterium bovis (Organon Technika, Chicago, IL). 5 x 10^8 BCG Organismen wurden gewaschen, und in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. BCG wurde freundlicherweise von Dr. Martin Thurnher zur Verfügung gestellt.

LPS:

Lipopolysacharid, (Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO, Endkonzentration: 100 ng/ml)

3.2.2 Gewinnung der dendritischen Zellen aus Buffy-coats oder Vollblut

Buffy coats wurden von der Blutbank der Innsbrucker Klinik zur Verfügung gestellt. Vollblut im Ausmaß von 100 – 200 ml wurde von freiwilligen Spendern entnommen. PBMCs wurden mit Hilfe eines Dichtegradienten mit Lymphoprep (1,077 g/ml; Nycomed Pharma, Oslo, N) gewonnen. Zur Entfernung der T-, B-Lymphozyten und NK-Zellen standen unten angeführte Methoden zur Verfügung. Für detaillierte Beschreibungen der verwendeten Methoden siehe Romani, et al. 1997.

(1) Immunomagnetische Depletion (direkt/indirekt) mit Hilfe von Dynabeads (Dynabeads, Deutsche Dynal GmbH, Hamburg, D)

(2) Rosettieren mit Test-neuraminidase (Behringwerke AG, Marburg, Deutschland)-behandelten Schaferythrozyten (Bundesanstalt für Tierseuchenbekämpfung, Mödling, A)

(3) Depletion durch Ausnützung der Adhärenzeigenschaften von Monozyten/Makrophagen, Verwerfen oder anderweitige Verwendung der nicht adhärenten Fraktion

3.2.2.1 Immunomagnetische direkte Depletion der Lymphozyten

1. Dynabeads M-450 Pan B (CD19) und Dynabeads M-450 Pan T (CD2) wurden in einem Verhältnis von 1 : 1 : 1 verwendet, das entspricht einem Verhältnis von je einem CD19- und CD2 -bead pro Leukozyt.
2. Vermischung der PBMCs mit den Dynabeads. (150 x 10^6 Zellen in 3 ml pro 15 ml Röhrchen)
3. 20 Minuten Inkubationszeit im "Dynal sample mixer" bei 4°C.
4. Durch Verwendung eines Magneten können die Dynabeads mit den an sie gebundenen B- und T-Zellen und NK-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 und NK-Zellen weiter zu verringern.

3.2.2.2 Immunomagnetische indirekte Depletion der Lymphozyten

1. PBMCs wurden 20 Minuten in einer 10% autologen Plasmalösung oder in einer 1% PBS-BSA-Lösung auf Eis inkubiert, um spätere unspezifische Bindungen zu verhindern.
2. 3-maliges Waschen mit PBS-EDTA
3. Monoklonale Antikörper gegen CD20, CD2 und CD3 wurden mit den PBMCs 30 Minuten auf Eis inkubiert.
4. 3-maliges Waschen mit PBS-EDTA um nicht-gebundene Antikörper zu entfernen.
5. Dynabeads M-450 Schaf-Anti-Maus IgG wurden im Verhältnis Beads : Leukozyten von 1 : 4 verwendet. Diese sekundären Antikörper binden an die Primärantikörper an der Oberfläche der T-, B- und NK-Zellen und machen sie dadurch zur immunomagnetischen Isolation bereit.
6. Weitere Prozedur siehe direkte Depletion Schritte 3 – 5.

3.2.2.3 Entfernen der T-Zellen und der NK-Zellen durch Rosettieren mit Neuraminidase behandelten Schaferythrozyten

1. Inkubation einer 5% Schaferythrozytenlösung (in RPMI) mit Neuraminidase (0,01 U/ml), 1h, 37°C im Wasserbad
2. Gewinnung der PBMCs über Lymphoprep
3. Inkubation der PBMCs mit Neuraminidase-behandelten Schaferythrozyten 1h auf Eis
4. Trennung der T-Zellrosetten und NK-Zellrosetten von Monozyten/Makrophagen und B-Zellen mit Hilfe von Lymphoprep
5. Monozyten/Makrophagen und B-Zellen wurden in 6-well-Platten (Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA) zu 2 x 10^6/well in 3ml Kulturmedium und Zytokine kultiviert (siehe Kapitel 3.2.3.1).

3.2.2.4 Depletion der Lymphozyten aufgrund ihrer Unfähigkeit zu adhärieren (Adhärenzmethode)

Die Vorteile der Adhärenzmethode sind eine einfache, schnelle Vorgansweise Die Zellen werden nicht durch „highly sophisticated methods" strapaziert und die Kostenersparnis im Vergleich zu anderen Methoden ist zu bedenken. Außerdem ist es ein oft wichtiger Faktor, vom gleichen Spender/Patienten MCM und reife dendritische Zellen zu gewinnen, obwohl man nur geringe Blutmengen zur Verfügung hat. Diese Vorgangsweise ist schematisch in Abb.4 dargestellt.

1. Herstellung von MCM. Siehe Kapitel 3.2.1.1.
2. Nach Abnahme des MCMs 2x-iges waschen der Petri-Schalen mit warmen PBS.
3. Auf die Petri-Schale mit dem Monolayer aus Monozyten/Makrophagen wurden 10 ml R10 oder autologes Medium mit 1000 U/ml IL-4 und 800 U/ml GM-CSF zugegeben (Tag 0). Am Tag 2 wurden 5 ml R10/IL-4/GM-CSF oder 5ml autologes Medium/ IL-4/GM-CSF ergänzt. Durch die Zytokinzugabe kommt es zur Ablösung der adhärenten Zellen.
4. Zwischen Tag 4 – 6 wurden die Zellsuspensionen abgenommen und abzentrifugiert (269 g, 4°C, 8 Minuten). Die Zellen wurden zu 1 x 10^6 in 6-well-Platten in Kulturmedium mit Zytokinen in der Regel 2 Tage weiterkultiviert.

3.2.3 Kultur der lymphozyten-freien PBMCs

3.2.3.1 Vorbereitungskultur oder "priming culture"

Lymphozyten-depletierte PBMCs wurden in 6-well-Platten (Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA) zu 2 x 10^6/well in 3ml Kulturmedium kultiviert. GM-CSF und IL-4 wurden in einer Endkonzentration von 800 U/ml und 1000 U/ml zugegeben. Die Kulturen wurden jeden zweiten Tag (Tag 2, 4, und 6) gefüttert, indem 1ml verbrauchtes Medium abgenommen und 1,5 ml neues Kulturmedium mit 1600 U/ml GM-CSF und 1000 U/ml IL-4 zugesetzt wurde. Am Tag 7 wurden nicht adhärente Zellen entweder geerntet und analysiert oder in Gegenwart oder Abwesenheit von Reifungsstimulantien weiterkultiviert.

3.2.3.2 Reifungskultur oder "differentiation culture"

Am Tag 7 wurden entweder 1,5 ml MCM mit 1000 U/ml IL-4 und 1600 U/ml GM-CSF oder 1,5 ml Kulturmedium mit 1000 U/ml IL-4 und 1600 U/ml GM-CSF und andere Reifungsstimulantien (z. B. TNF-α) zugesetzt. Am Tag 10 oder 11 wurden die Zellen gesammelt, gezählt und phänotypisch, morphologisch und funktionell analysiert.

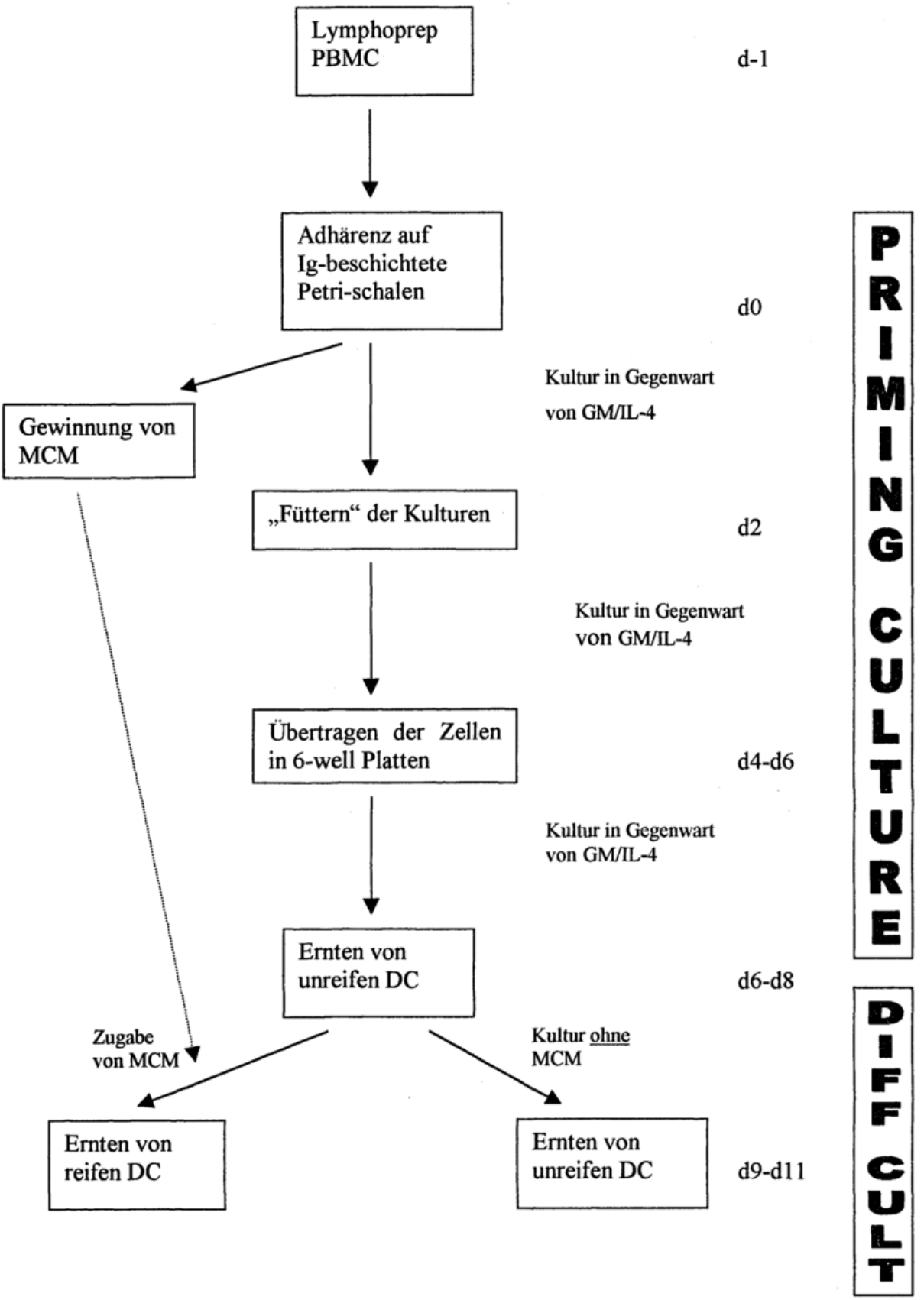


Abb.4: Flow-Diagramm der Adhärenzmethode. (Diff cult = Differentation culture, Reifungskultur)

3.2.4 Immunfluoreszenzfärbungen und Immunhistochemie

In Tabelle 4 sind die primären Antikörper, die für Flowzytometrie und Immunhistochemie verwendet wurden, aufgelistet. Als sekundäre Antikörper wurde bei der Dreistufenfärbung biotinyliertes Anti-Maus (Amersham, species-specific whole antibody, Codenr. 1001) oder Anti-Ratte Ig (Amersham, species-specific whole antibody, Codenr. 1002), gefolgt von FITC- oder PE- konjugiertem Streptavidin (Amersham International, Amersham, UK) verwendet. Bei der Zweistufenfärbung wurden als sekundäres Reagenz FITC- oder PE-konjugiertes Anti-Maus-Immunglobulin (Code No. F0313, DAKO, Roskilde, DK,) oder FITC-konjugiertes polyklonales Anti-Ratte-Immunglobulin (Catnr. 12114D, Pharmingen, San Diego, CA) verwendet. Diese Zellen wurden in der Regel unfixiert, unmittelbar nach der Färbeprozedur analysiert. Tote Zellen wurden aufgrund ihrer Eigenschaft mit Propidiumiodid im roten Fluoreszenzbereich sichtbar zu werden, ausselektioniert. Die FACS-Analysen wurden auf einem FACSscan-Gerät (Becton Dickinson, Mountain View, CA) durchgeführt. Zytozentrifugenpräparate wurden mit einer „Zytospin 2" Zentrifuge (Shandon, Pittsburgh, PA) gemacht. Die Präparate wurden für 5 Minuten mit Azeton bei Raumtemperatur fixiert und für 30 Minuten mit dem primären Antikörper inkubiert. Als sekundäre Reagenzien wurden biotinyliertes Schaf-Anti-Maus Ig (1:200; Amersham) und Texas Red-konjugiertes Streptavidin (1:50; Amersham) verwendet. Bei einer Doppelfärbung erfolgte als nächster Schritt eine Blockierung mit 100 µg/ml Maus-Gammaglobulin, um dann mit FITC-konjugiertem Anti-HLA-DR (Becton Dickinson) gegenzufärben. Die Objektträger wurden mit „Vectashield" (Vector Laboratories, Burlingame, CA) eingedeckt.

3.2.5 Allogene gemischte Leukozytenreaktion

Die dendritischen Zellen wurden mit 30 Gy von einer Cs-Quelle bestrahlt, um jegliche Proliferation der stimulierenden Zellen auszuschließen. Als Responders (antwortende Zellen) wurden allogene T-Zellen oder Nabelschnur-T-Zellen verwendet. Die aus dem Nabelschnurblut gewonnenen T-Zellen wurden verwendet, um eine reine primäre Immunantwort zu induzieren. Hierbei geht man davon aus, daß es sich bei diesen Zellen um naive, noch nie mit Antigen in Kontakt getretenen T-Lymphozyten handelt (Sallusto et al., 1994). T-Zellpopulationen aus dem peripheren Blut bestehen immer aus einem Gemisch von naiven und Memory-T-Zellen. Tripletts von dendritische Zellen und 150000 - 200000 allogene T-Zellen wurden in 96-well-Flachbodenmikrotiterplatten (Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA) inkubiert Die Proliferation der T-Zellen wurde von Tag 6 auf Tag 7 mit der Zugabe von 4 µCi-148 KBq/ml von [^{3}H]TdR (spezifische Aktivität 247,9 GBq/mmol = 6,7 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, MA) in Triplikaten bestimmt. Die Zellen wurden 12 – 16 h im Brutschrank inkubiert und anschließend geerntet (Romani, et al., 1989) und die inkorporierte Radioaktivität im Flüssig-Szintillationszähler gemessen.

3.2.6 Gewinnung von T-Zellen aus peripherem Blut und Nabelschnurblut

(1) Nabelschnurblut

1. Für die Nabelschnur-T-Zellen wurden Petri-Schalen (Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA) mit 50 µg/ml Goat-Anti-Mause Gammaglobulin (Jackson, Immuno Research Lab., West Grove, PA) inkubiert und 1 h bei RT inkubiert.
2. Die Schalen wurden 3 mal mit PBS gewaschen. Sie wurden meist frisch verwendet, sind allerdings einen Tag auf 4°C haltbar.
3. Die PBMC´s aus dem Nabelschnurblut wurden mittels Lymphoprep gewonnen (siehe Kapitel 3.2.2 und Kapitel 3.2.2.3) und mit einem Antikörpercocktail (MHC II, VIE – G4, CD19) 30 min auf Eis inkubiert.
4. 40 x 10^6 der im Antikörpercocktail inkubierten PBMCs, mit 10ml Medium auf die beschichteten Petri-Schalen geben, 30 min bei RT inkubieren.
5. Die nicht adhärenten Zellen (= T-Zellen) wurden gesammelt, abzentrifugiert (269g, 8 min., 4°C), gezählt und im Assay verwendet oder bei –80 °C in Einfriermedium (90% FCS und 10% Dimethylsulfoxid (Merk, Darmstadt, D)) aufbewahrt.

(2) T-Zellen aus peripherem Blut

1. Vorgangsweise wie in Kapitel 3.2.2.3, Punkte 1 bis 5
2. Die rosettierten T-Zellen im Pellet im Original Lymphoprep Röhrchen mit 25 ml RPMI resuspendieren und dann 25 ml 1,66% Ammoniumchlorid (Merck, Darmstadt, D) in PBS bei RT zugeben. In der Hand die Suspension mischen bis sie klar wird, d.h. bis die Erythrozyten lysiert sind.
3. Bei 200 g abzentrifugieren; dann nochmals 2x mit RPMI bei 460 g waschen
4. T-Zellen zählen, und bei –80 °C oder im flüssigem Stickstoff in Einfriermedium (90% FCS und 10% DMSO (Merck, Darmstadt, D)) aufbewahren

3.2.7 Stabilitätstest

Bei diesem Assay wurde die Stabilität der reifen dendritischen Zellen in Morphologie, Phänotyp und Funktion untersucht.

Die DCs wurden 3-mal gewaschen und 2,5 x 10^5/well in einer 12-well-Platte (Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA) im Kulturmedium *ohne* Zytokine ausgesät. Nach 48 Stunden wurde morphologisch (Phasenkontrastmikroskopie), phänotypisch (Durchflußzytometrie) und funktionell (T-Zellstimulationsassay) überprüft, ob die dendritischen Zellen noch ihren Habitus als reife DC behielten oder ob sie zu adhärenten Vorläuferzellen revertierten (Romani, 1996).

3.2.8 ELISA für TNFα, IL-1β und IL-12

Bei den ELISAs zum Nachweis von TNF-α (CLB, Amsterdam, Niederlande) und IL-1β (Medgenix, Fleurus, Belgien) handelte es sich um kommerzielle Kits. Sie wurden freundlicherweise vom Zentrallabor für innere Medizin (Dr. Manfred Herold) gemacht. Beim ELISA zum Nachweis von IL-12 (p75 Heterodimer-spezifisch) handelte es sich um einen Sandwichelisa (Krösbacher, in Vorb.), der freundlicherweise von Beate Krösbacher gemacht wurde. Die Reagenzien erhielten wir von Dr. D. Presky, Hoffman-La-Roche, Nutley, NJ (Wilkinson et al., 1996; Gately et al., 1995).

3.2.9 Nachweis von Nitrit

Der Nitritnachweis erfolgte, indem 50 µl Kulturüberstand und 100 µl Griess – Ilosvays Reagenz für Nitritbestimmung (Merck, Darmstadt, D) in eine 96-well-Flachbodenmikrotiterplatten pipettiert wurden. Es folgte 5 –10 min Inkubation bei RT und anschließend eine photometrische Messung bei 550 nm. Die µM Nitrit wurden anhand einer Standardgeraden/kurve errechnet.

4. Ergebnisse

4.1. Vergleichende Analysen der verschiedenen Züchtungsmethoden

4.1.1. Adhärenzmethode im Kultursystem mit fetalem Kälberserum (FCS)

4.1.1.1. Ausbeute und Anreicherung

Die Adhärenzmethode ist eine einfache, schnelle und kostengünstige Methode, sowohl dendritische Zellen, als auch MCM vom selben buffy-coat/Spender zu gewinnen. Ausbeute und Anreicherung entspricht dem Niveau von anderen häufig verwendeten Methoden. Ausbeuten und Anreicherung an dendritischen Zellen wurden anhand der Ergebnisse bei Zellzählungen errechnet. Es wurde zwischen „großen", „kleinen" und „toten" Zellen im Hämazytometer unterschieden. Die „großen Zellen" zeigten die typische sonnenförmige Gestalt der dendritischen Zellen und wurden im weiteren Arbeitsverlauf phänotypisch und funktionell analysiert. Die „kleinen" Zellen entsprachen residualen Lymphozyten.

In diesem Punkt werden Ausbeute und Anreicherung von dendritischen Zellen, die mit der Adhärenzmethode gewonnen wurden, aufgezeigt. Außerdem wird diese von mir etablierte Methode mit DCs, die aus Ausgangspopulationen gezüchtet wurden, die auf andere Weisen von Lymphozyten depletiert worden waren (Rosettierung mit Neuraminidase-behandelten Schaferythrozyten, magnetische Beads), verglichen.

Tab. 5: Ausbeute und Anreicherung von dendritischen Zellen, die mit der Adhärenzmethode gewonnen wurden. Die Zellen wurden aus buffy-coats gewonnen und in R10 kultiviert. Die Prozent der Ausbeute der DCs ist auf die Zahl der Ausgangs-PBMC bezogen. MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

Gesamtzahl der PBMC aus einem buffy-coat (x 10^6) d-1	Zahl der PBMCs pro IgG-beschichteter Petrischale (100 mm ∅) (x 10^6) d-1	Ausbeute der DCs am Tag des Übertragens von der Petrischale in die 6-well-Platte d4-6(%)	Anreicherung d.h. Zahl aller lebenden großen Zellen am Tag des Übertragens (%) d4-6	Ausbeute von DCs (Summe von unreifen und reifen am d12) (%)
290	58	8,1	86	1,5
300	50	12,9	85	6,2
438	54,7	10,2	77	4,1
200	50	5,0	56	5,0
503	50	4,2	80	3,6
435	50	2,2	73	1,3
556	69,5	16,4	86	5,4
348	49	8,5	78	2,9
537	59	15	93	4,0
225	45	8,7	76	2,2
370	61	11,4	91	2,2
600	75	7,8	94	0,4
325	54	5,0	82	4,5
447	55,8	4,0	83	4,6
347	50	5,0	68	6,3
350	50	3,6	70	3,5
300	50	4,0	70	3,4
292	48,7	3,0	83	0,8
720	60	3,5	81	4,7
365	52	8,5	92	8,5
378	54	3,6	91	1,7
460	51	7,0	91	5,4
360	51	5,8	62	3,9
312	52	10,2	95	5,4
364	40	11,8	74	5,2
397	39,7	6,1	60	2,2
297	42	1,5	89	0,9
496	49,6	1,6	86	0,8
203	44	4,2	69	3,1
481	43,8	2,5	92	1,4
216	43,2	7,0	68	3,4
255	42,5	9,4	72	1,8
MW 380	**MW 51,4**	**MW 6,8**	**MW 80,0**	**MW 3,5**
SD ±120	SD± 7,7	SD± 3,8	SD ±10,6	SD ±1,9

Der aus 32 Versuchen ermittelte Mittelwert der Ausbeute von reifen und unreifen dendritischen Zellen am Tag der Auswertung beträgt 3,5 % (Standardabweichung ±1,9) (Tab.5). Diese Ausbeute liegt im Bereich von DCs die mit Neuraminidase-behandelten Schaferythrozyten gewonnen wurden (Tab.6). Die Ausbeute mit den magnetischen Beads ist allerdings doppelt so hoch wie bei diesen beiden Methoden (Tab.6). Die Mittelwerte der

Ausbeute von DCs mit den Standardabweichungen sind in Abb.5 dargestellt. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant (Student´s t-Test).

Tab. 6: Ausbeute und Anreicherung von dendritischen Zellen, die mit Methoden gewonnen wurden, in denen die Lymphozyten mit Neuraminidase-behandelten Schaferythrozyten und magnetischen Beads depletiert wurden. Die Zellen wurden aus buffy-coats gewonnen und in R10 kultiviert. Die Prozent der Ausbeute der DCs ist auf die Zahl der Ausgangs-PBMC bezogen. MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

Mit Hilfe von Neuraminidase-behandelten Schaferythrozyten gewonnene DCs			
Gesamtzahl der PBMC aus einem buffy-coat (x 10^6)	**Monozyten nach der Depletion d0 (%)**	**Ausbeute von DCs am d10 - d12 (%)**	**Anreicherung von DCs am d10-d12 (%)**
106	7,9	2,4	65
583	13,4	5,5	65
529	11,2	3,3	80
319	15,7	3,3	81
481	20,0	4,4	89
625	21,9	2,3	42
828	23,2	2,7	54
417	18,7	2,9	51
531	5,5	2,3	55
460	22,6	7,1	62
MW 488	**MW 16,0**	**MW 3,6**	**MW 64**
SD ±181	SD ±6,0	SD ±1,5	SD ±14,2
Mit magnetischen Beads (indirekte und direkte Depletion) gewonnene DCs			
Gesamtmenge der PBMC´s aus einem buffy-coat (x 10^6)	**Monozyten nach der Depletion d0 (%)**	**Ausbeute von DCs am d10-d12 (%)**	**Anreicherung**
396	27,0	8,4	90
365	23,0	8,2	87
250	14,0	10,0	84
361	9,0	1,2	58
284	19,7	5,3	79
211	35,0	7,5	52
168	10,0	1,7	67
MW 290	**MW 19,7**	**MW 6,0**	**MW 74,0**
SD ±80	SD± 8,8	SD ±3,2	SD±14,0

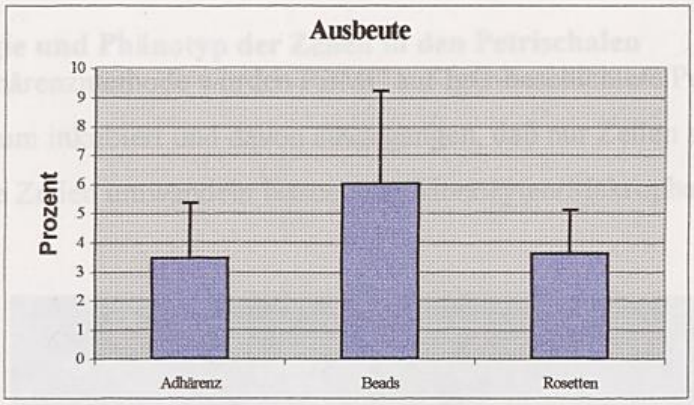


Abb.5: Vergleich der Ausbeuten am d10 – d12 von unreifen und reifen DCs mit drei unterschiedlichen Methoden der DC-Gewinnung. Die Ausbeute wurde als Prozentsatz der Zahl der Ausgangs-PBMC dargestellt Standardabweichungen sind dargestellt.

Die Anreicherung der dendritischen Zellen am d10-d12 betrug mit der Adhärenzmethode 80%. Damit ist diese Methode effektiver als die mit Neuraminidase-behandelten Schaferythrozyten gewonnenen DCs (Abb.6). Die Adhärenzmethode und die Verwendung von magnetischen Beads erreichten einen annähernd im gleichen Bereich liegenden Prozentsatz (Abb.6). Auch hier erreichten die Unterschiede keine statistische Signifikanz.

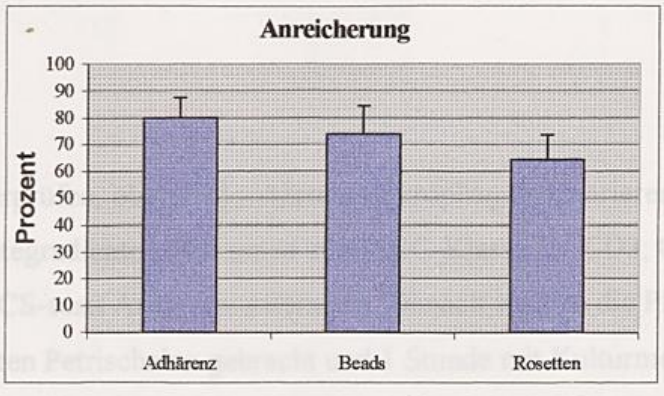


Abb.6: Vergleich des Prozentsatzes der DCs von allen viablen Zellen (d.h. Anreicherung) DCs am d10-d12, die mit drei unterschiedlichen Methoden gewonnen wurden. Der Wert gibt den Prozentsatz der Zellen mit typischer Morphologie an (große Zellen, unregelmäßig geformt).

4.1.1.2. Morphologie und Phänotyp

Morphologie und Phänotyp der Zellen in den Petrischalen

Mit der Adhärenzmethode wurden PBMC auf IgG-beschichtete Petrischalen gebracht, in Kulturmedium inkubiert und davon ausgegangen, daß nur Zellen adhärieren, die sich in dendritische Zellen umwandeln lassen oder Monozyten/Makrophagen (Abb.7).

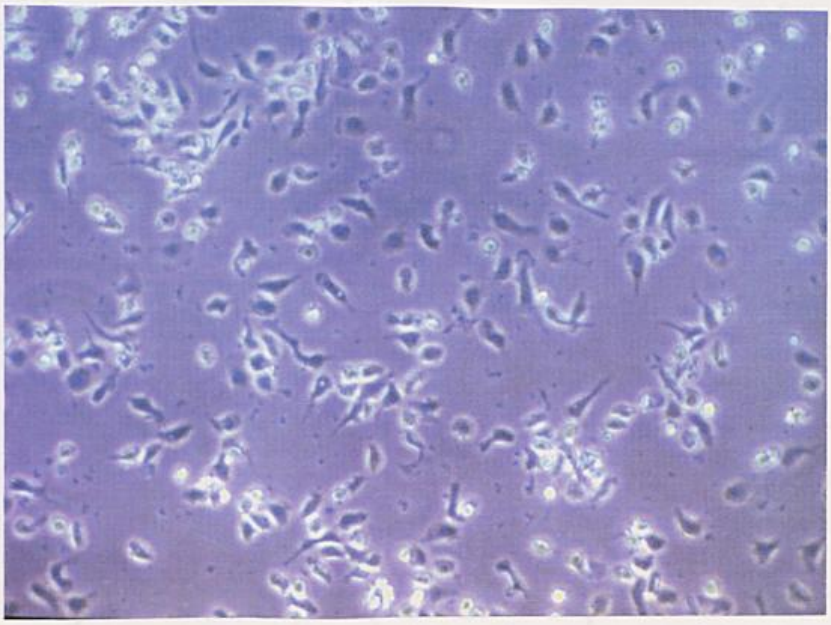


Abb.7: Auf einer mit IgG-beschichteten Petrischale adhärierende Monozyten/Makrophagen. Die Petrischale wurde mit IgG beschichtet und mit 50 x 10^6 PBMC 1 Stunde in Kulturmedium inkubiert und nicht adhärente Zellen wurden weggewaschen.

Um zu überprüfen, ob nur Monozyten/Makrophagen adhärieren, wurden die PBMC über einen Dichtegradienten gewonnen und MHC-Klasse II , CD3, CD14 und CD19 Expression mittels FACS-scan Analysen untersucht. Danach wurden die PBMC´s auf die mit IgG-beschichteten Petrischalen gebracht und 1 Stunde mit Kulturmedium inkubiert (Abb.7). Die nicht adhärierenden Zellen wurden wieder mittels FACS-scan Analysen untersucht. Bei der Abnahme des MCM 24 Stunden später wurden die wenigen vom Monolayer abgelösten Zellen nochmals analysiert (Abb.8).

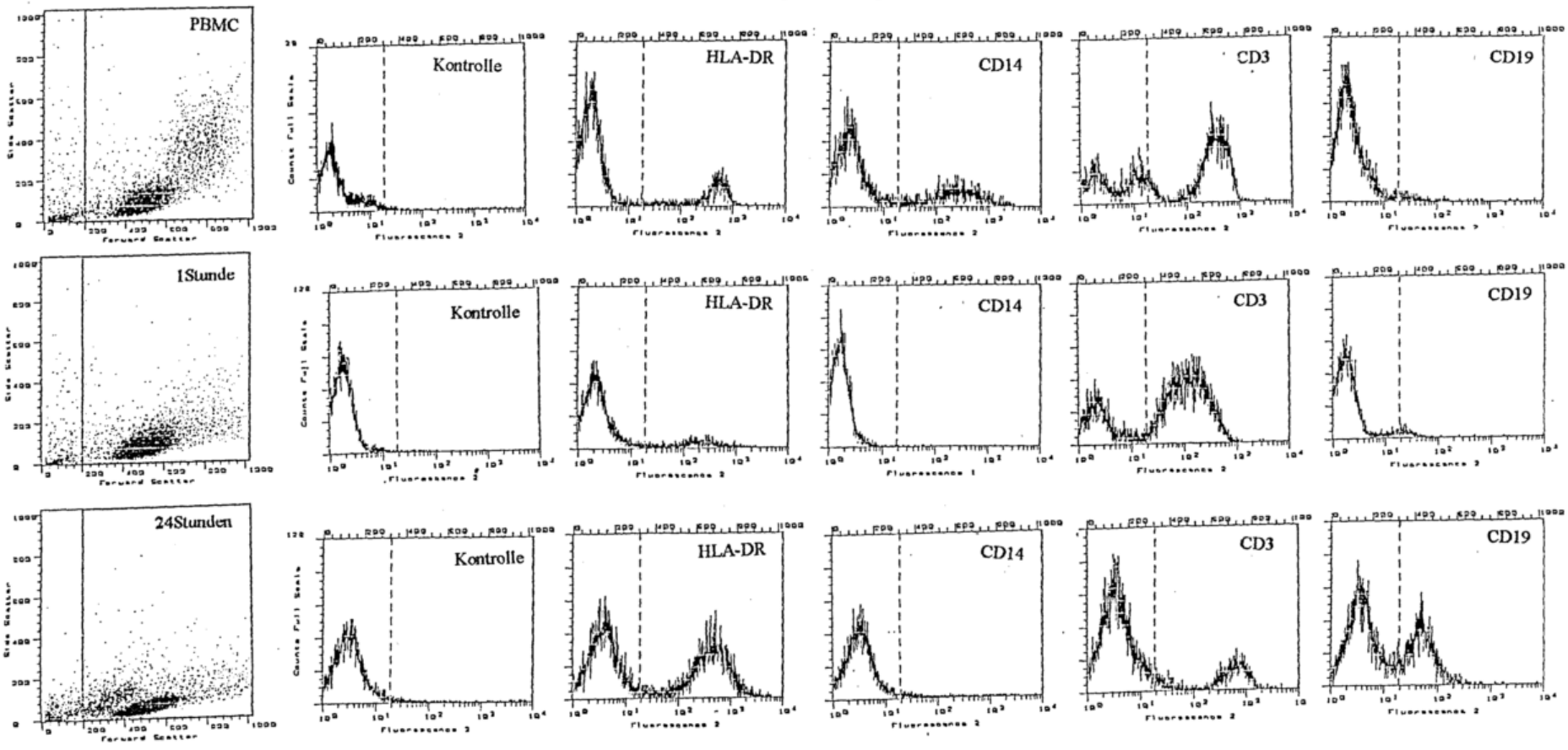


Abb.8: FACS-scan Analysen der PBMC (oben) und der Zellen im Überstand 1 Stunde nach Inkubation (Mitte) und 24 Stunden nach Inkubation (unten). Die Analysen wurden bei 3 Experimenten durchgeführt, eines davon ist hier dargestellt. Die Histogramme stellen im FSC/SSC gegateten Zellen dar. Dieses Gate schließt praktisch alle Zellen in die Analyse ein. Ausgeschlossen werden lediglich subzelluläre Partikel und Debris (links der Markerlinie in den Dot Plots ganz links)

Wie man aus Abb.8 ersieht, waren nach einer Stunde Inkubation die nicht adhärenten Zellen CD14 negativ: alle CD14+ Zellen adhärieren also. MHC-Klasse II positive Zellen wurden im Überstand weniger und CD3-positiven Zellen wurden im Überstand mehr. CD19-positive Zellen schienen nach einer Stunde Inkubation im Überstand nicht mehr auf, d.h. die B-Zellen adhärierten ebenfalls an den Petrischalen. 24 Stunden später zeigte sich, daß CD19-positive Zellen , d.h. B-Zellen sich gelöst hatten und nur mehr Vorläufer und Monozyten/Makrophagen an das IgG gebunden waren.
Das bedeutet, daß die B-Zellen ebenfalls zum Zytokincocktail im MCM beitrugen.

Wieviele Zellen sich bis zum Tag des Übertragen lösten, war absolut unterschiedlich. Es konnte nicht festgestellt werden wovon das Lösen abhing. In manchen Fällen hatten sich am d3-d4 schon mehr als 80% der adhärenten Zellen gelöst und wurden am d4 übertragen. Diese Zellen stellten sich in der Regel als „ungewöhnlich" heraus, da sich im Endeffekt wenig reife „real DCs" bildeten. Als Norm könnte man sagen, daß sich ca. 60% der adhärenten Zellen bis d5 lösten, oft wurde an diesem Tag auf die gewaschenen Platten nochmals Zytokine zugegeben und diese erneut 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Hier lösten sich meist nochmals ca. 10% der auf den Platten verbliebenen Zellen. Diese Zellen ließen sich meist gut durch MCM-Zugabe zu DCs transformieren. Diese Ergebnisse wurden durch Zählungen der verbliebenen adhärenten Zellen verifiziert, allerdings wurden diese Zählungen nicht konsequent betrieben und die Zahlen der gelösten Zellen als „gut" oder „schlecht" bewertet.

Morphologie und Phänotyp der dendritischen Zellen die mit der Adhärenzmethode gewonnen wurden, vor und nach MCM

Morphologie

DCs die mit der Adhärenzmethode gewonnen wurden und sozusagen im „eigenen" MCM reiften, zeigten eine ausgeprägte und typische dendritische Zellmorphologie (Abb.9).

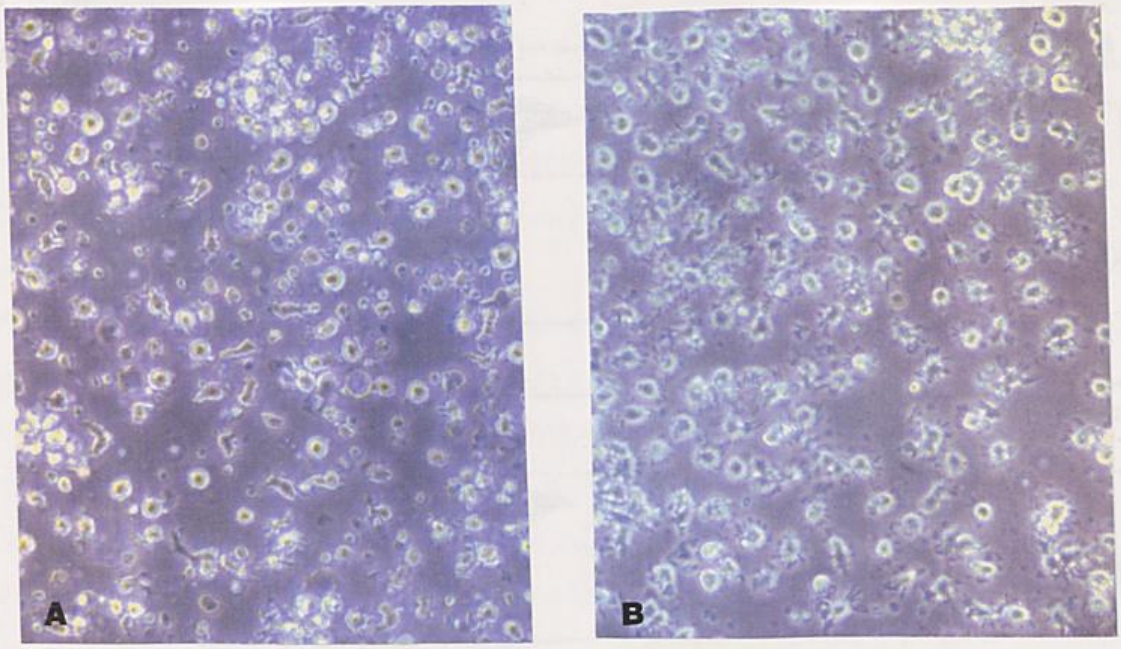


Abb.9: (A) Morphologie von DCs die in R10+GM-CSF+IL-4 mit der Adhärenzmethode kultiviert wurden = unreife DCs. (B) Morphologie von DCs die mit MCM im FCS-haltigen Kulturmedium zur Reifung gebracht wurden. Man beachte die polymorphe Form und die ausgeprägt langen zytoplasmatischen Ausstülpungen/Segel („Veils") der reifen Zellen.

Phänotyp

reife dendritische Zellen

Der Phänotyp der reifen DC, gewonnen mit der Adhärenzmethode, unterschied sich nicht von DCs die mit anderen Methoden kultiviert wurden.

Die Zellen exprimierten große Mengen an MHC-Klasse II, genauso wie akzessorische Moleküle zur T-Zellstimulation (CD40, CD80, CD86,). CD1a, CD4 wurde ebenso stark exprimiert wie CD45RO. Hingegen sank die Expression von CD45RA und des Adhäsionsmoleküls CD44v9 im Zuge der Reifung (Abb.10). Als typischer Reifungsmarker von DCs wurde CD83 etabliert (Zhou and Tedder, 1995; Zhou and Tedder, 1996). CD115, der Marker für den M-CSF-Rezeptor, ist bei reifen dendritischen Zellen negativ (Pope et al., 1995) und bei unreifen positiv (Abb.12).

+MCM

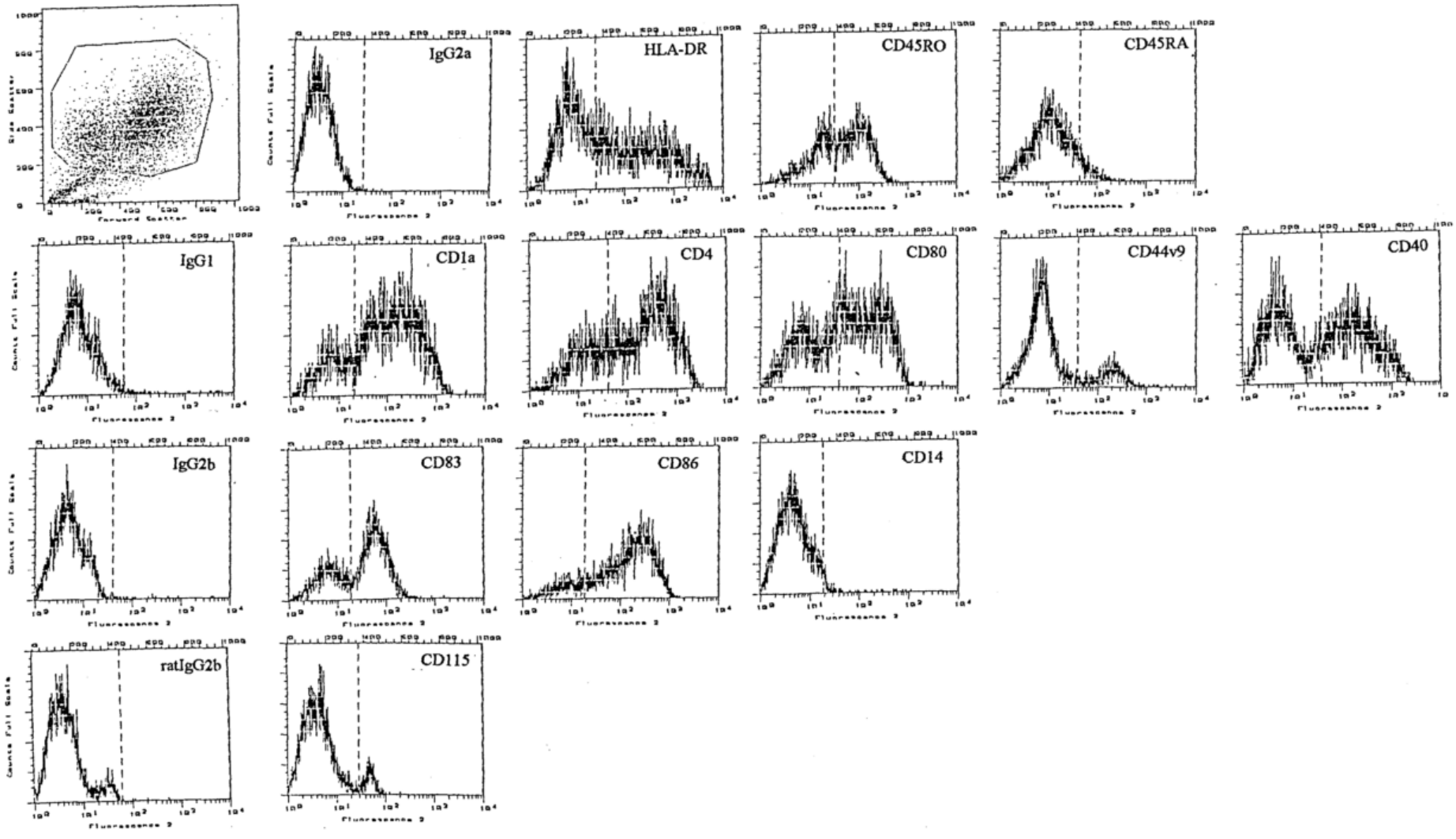


Abb.10: FACS-scan Analysen von dendritischen Zellen, die mit R10+GM-CSF+IL-4 + MCM kultiviert worden sind (reife dendritische Zellen). Die Zellen wurden mit der Adhärenzmethode gewonnen und die Abbildung ist für 10 Versuche repräsentativ. Die Histogramme der FACS-scan Analysen stellen die im FSC/SSC gegateten Zellen dar.

unreife dendritische Zellen

Bei der Untersuchung der in R10+GM-CSF+IL-4 kultivierten Zellen, die mit der Adhärenzmethode gewonnen wurden, zeigte sich, daß in vielen Fällen die unreifen DCs polymorpher, granulierter und teils auch sonnenförmiger mit mehr Fortsätzen waren, als DCs die mit magnetischen Beads oder Neuraminidase-behandelten Schaferythrozyten gewonnen wurden.

Es wurden 26 Experimente durchgeführt. Dabei entsprach der Phänotyp von unreifen DCs, gewonnen mit der Adhärenzmethode, entsprach in 62% der Fälle (14 Experimente) dem Bild von d7-d10 DCs die in R10+GM-CSF+IL-4 kultiviert wurden und mit anderen Methoden gewonnen wurden. Aber in 38% der Analysen von DCs (11 Experimente), die mit Adhärenz gewonnen wurden, waren die „unreifen" DCs zu mehr als 20% CD83 positiv (Abb.11). Im extremsten Fall wurde in einem Versuch beobachtet, daß sowohl Zellen, die in R10+GM-CSF+IL-4 als auch die Zellen die zusätzlich am d7 MCM erhielten, am d10 zu 80% CD83 positiv waren!

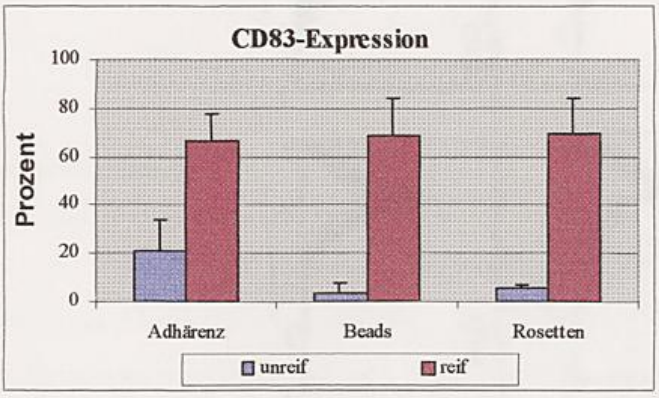


Abb.11: Vergleich der CD83 Expression bei unreifen und reifen DCs, die entweder mit der Adhärenzmethode, mit magnetischen Beads oder durch Rosettierung mit Neuraminidase-behandelten Schaferythrozyten gewonnen wurden. Die CD83 Expression wurde in Prozent der CD83 positiven Zellen dargestellt. Die Daten wurden mit Hilfe von FACS-scan Analysen gewonnen. Bei der Adhärenzmethode wurden aus 26 Versuche das Mittel gebildet und bei den magnetischen Beads und Neuraminidase-behandelten Schaferythrozyten aus jeweils 10 Versuchen.

Bei 60% der Versuche waren die Zellen CD83 negativ, CD115 und CD15s positiv. Sie exprimierten weniger MHC-Klasse II und B7-1 und B7-2. Das Molekül CD45RA wurde im Gegensatz zu reifen DCs bei unreifen DCs exprimiert. Die DCs entsprachen dem typischen Bild von unreifen dendritischen Zellen (Abb.12).

R10+GM-CSF+IL-4

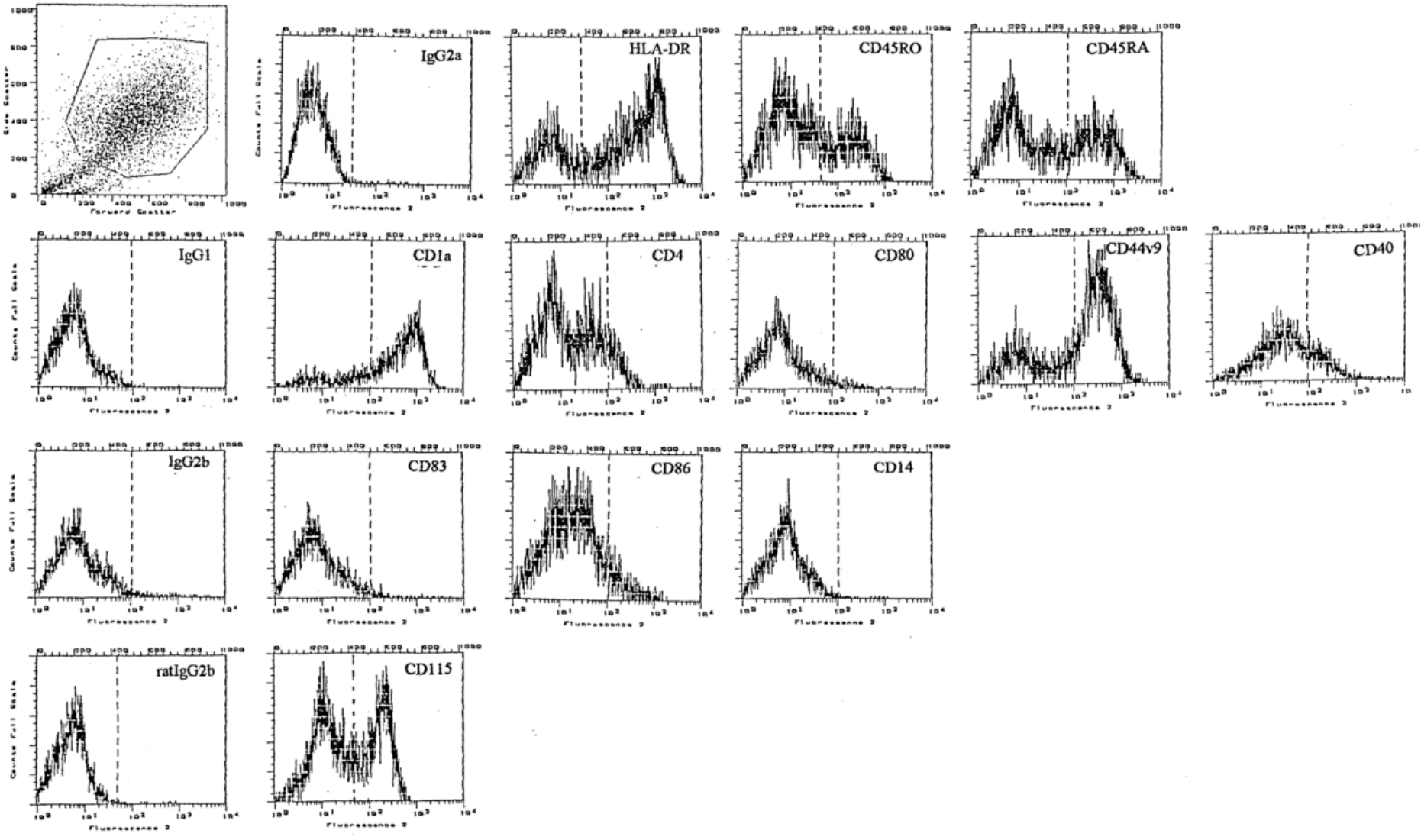


Abb.12: FACS-scan Analysen von dendritischen Zellen die in R10+GM-CSF+IL-4 gewonnen wurden (unreife dendritische Zellen). Die Zellen wurden mit der Adhärenzmethode gewonnen und die Abbildung ist für 10 Versuche repräsentativ. Die Histogramme der FACS-scan Analysen stellen die im FSC/SSC (ganz oben links) gegateten Zellen dar. Als Vergleich dazu Abb. 10 mit dem Phänotyp von reifen DCs.

4.1.1.3. T-Zell stimulatorische Funktionn

Die Reifung der dendritischen Zellen im „eigenem“ MCM steigert die Fähigkeit der APC´s ruhende T-Zellen zu stimulieren.

Dendritische Zellen die mit der Adhärenzmethode gewonnen wurden, zeigten nicht nur phänotypisch, sondern auch funktionell das klassische Bild: reife dendritische Zellen stimulieren allogene ruhende T-Zellen besser als unreife dendritische Zellen. In Abb.13 wurden die Stimulation von ruhenden T-Zellen durch DCs, die mit der Adhärenzmethode gewonnen wurden, dargestellt.

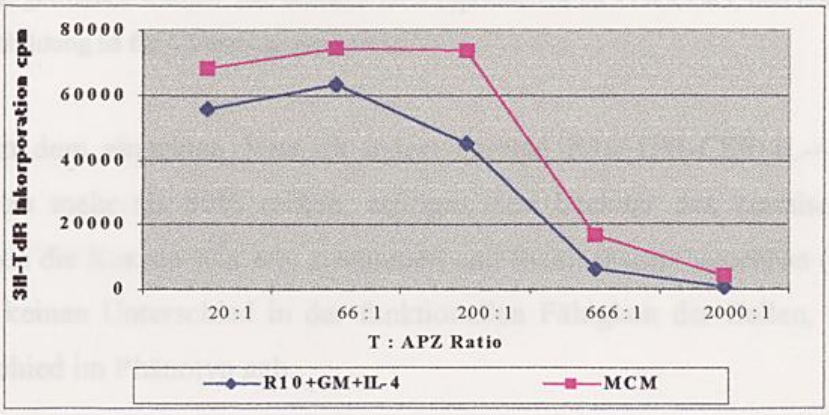


Abb.13: Immunostimulatorische Funktion von reifen (rot) und unreifen (blau) DCs, die mit der Adhärenzmethode gewonnen wurden. Diese Abbildung ist für 11 Versuche repräsentativ.

Im vorherigem Abschnitt wurde gezeigt, daß unreife DCs ($CD83^-$, $CD86^{\pm}$, $CD115^+$) die mit der Adhärenzmethode gewonnen wurden, in 38% der Experimente phänotypisch nicht unreifen DCs entsprachen. Die Fähigkeit ruhende T-Zellen zu aktivieren war bei Zellen, die ohne MCM kultiviert wurden immer geringer, als bei Zellen, die mit MCM kultiviert wurden, so auch in diesen Experimenten (Abb.14).

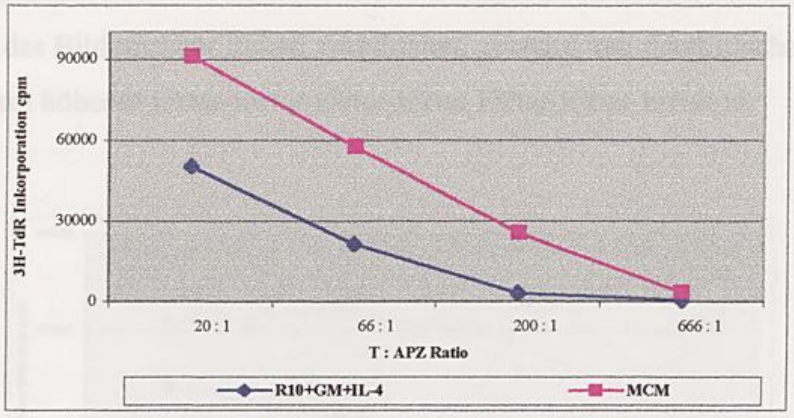


Abb.14: Immunostimulatorische Funktion von reifen (rot) und unreifen (blau) DCs, die mit der Adhärenzmethode gewonnen wurden. Die unreifen DCs exprimierten zu 27% CD83, und nur mehr zu 30% CD115. Diese Abbildung ist für 6 Versuche repräsentativ.

Einzig in dem einzelnen Versuch indem sowohl R10+GM-CSF+IL-4-Zellen und MCM-Zellen zu mehr als 80% reiften, erfolgte eine Umkehr des klassischen Bildes. Allerdings lagen die Kurven sehr eng zusammen und liefen absolut synchron (Abb.15). Es gab praktisch keinen Unterschied in der funktionellen Fähigkeit der Zellen, wie es auch keinen Unterschied im Phänotyp gab.

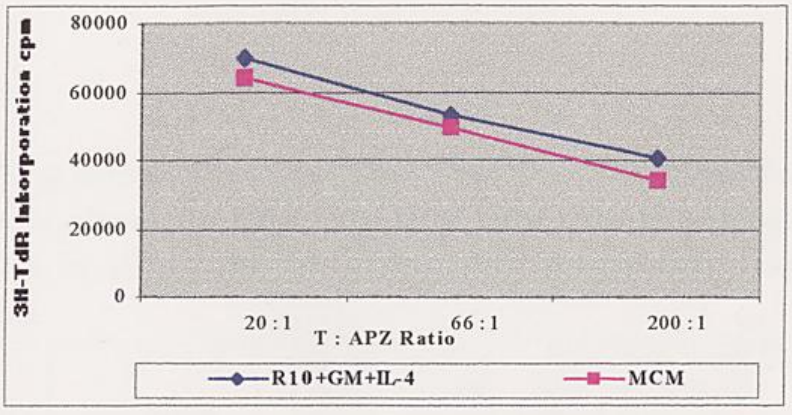


Abb.15: Immunostimulatorische Funktion von reifen (rot) und unreifen (blau) DCs, die mit der Adhärenzmethode gewonnen wurden. Diese unreifen und reifen DCs exprimierten beide zu 80% CD83; CD115 wurde nicht exprimiert.

Die Fähigkeit ruhende T-Zellen zu aktivieren war bei Zellen die ohne MCM kultiviert wurden immer geringer, als bei Zellen die mit MCM kultiviert wurden; selbst dann, wenn die mit MCM kultivierten Zellen keine oder eine sehr geringe (<5%) CD83 Expression zeigten (Abb.16). Auch alle anderen Marker, die Reifung charakterisieren, zeigten das Bild

von nicht vollständig gereiften Zellen. Allein die Zugabe von MCM, selbst wenn die DCs phänotypisch das Bild unreifer Zellen ausbildeten, genügte, um dendritische Zellen mit einer signifikant höheren immunostimulatorischen Fähigkeit zu erhalten.

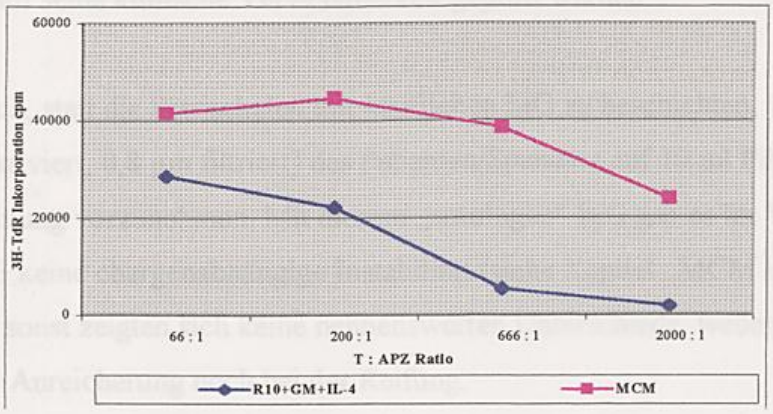


Abb.16: Immunostimulatorische Funktion von reifen und unreifen DCs , die mit der Adhärenzmethode gewonnen wurden. Die unreifen DCs exprimierten nur zu <5% CD83, und 40% CD115. Diese Abbildung ist für 3 Versuche repräsentativ.

4.1.2. Adhärenzmethode im Kultursystem ohne fetalem Kälberserum (FCS)

In Anbetracht der Verwendung der dendritischen Zellen zur Tumortherapie wurde als wichtiger Punkt erachtet, die DCs in einem FCS-freien System zu kultivieren. Jedes Reagenz muß auf seine klinische Verwendbarkeit geprüft werden.

Es bewährte sich, statt die Petrischalen mit käuflichen IgG zu beschichten, 100µl Serum (nicht hitzeinaktiviert, 0,8 µm filtriert) des Patienten/Spenders auf 10 ml PBS zu geben und so die Beschichtung vorzunehmen. Mit diesem „autologen" IgG gab es im Vergleich mit käuflichem IgG keine chargenabhängige Instabilität (siehe Kapitel „MCM ist nicht MCM"). Auch sonst zeigten sich keine nennenswerten Unterschiede, weder in der Ausbeuten und Anreicherung noch bei der Reifung.
Und der Vorteil liegt auf der Hand: dieses IgG ist leicht erhältlich und „autolog".

4.1.2.1. Ausbeute und Anreicherung

Im FCS-freien System lagen die Ausbeuten von unreifen und reifen dendritischen Zellen am d10-d12 mit allen drei Methoden im gleichen Bereich; von 2,2% - 2,4% (Tab.7, Tab.8), bezogen auf die Zahl der Ausgangs-PBMC (Standardabweichungen zwischen 0,8% und 1,8%).

Tab. 7: Ausbeute und Anreicherung von dendritischen Zellen mit der Adhärenzmethode im FCS-freien System. Die Zellen wurden aus 90 – 220 ml Blut von freiwilligen Spendern gewonnen. Die Prozent der Ausbeute der DCs ist auf die Zahl der Ausgangs-PBMC bezogen. MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

Blutmenge (ml)	PBMC ($x10^6$)	Anreicherung d.h. Prozent aller lebenden großen Zellen von allen Zellen am Tag des Übertragens (%)	Ausbeute der DCs am Tag des Übertragens von der Petrischale in die 6-well-Platte (%)	Ausbeute von unreifen und reifen DCs am d10 - d12 (%)
90	190	86	5,0	2,3
220	238	90	2,0	1,1
150	110	93	4,8	3,5
140	165	71	3,7	1,8
140	300	80	8,8	3,4
120	100	90	4,8	2,4
		MW 85,0	**MW 4,9**	**MW 2,4**
		SD ±7,5	SD ±2,0	SD ±0,8

Tab. 8: Ausbeute und Anreicherung von dendritischen Zellen mit magnetischen Beads und Neuraminidase-behandelten Schaferythrozyten im FCS-freien System. Die Zellen wurden aus 100 – 200 ml Blut von freiwilligen Spendern gewonnen. Die Prozent der Ausbeute der DCs und der Monozyten ist auf die Zahl der Ausgangs-PBMC bezogen. MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

Rosetten				
Blut (ml)	**PBMC (x 10^6)**	**Monozyten nach Depletion d0 (%)**	**Ausbeute von DCs am d10-d12 (%)**	**Anreicherung d.h. Prozent aller DCs am d10-d12**
100	141	17,5	4,6	64,0
200	262	4,8	0,9	52,8
100	197	15,2	1,3	56,0
100	225	15,0	1,1	47,0
100	127	23,6	4,6	68,7
100	112	9,6	0,3	63,0
100	93	16,1	1,2	51,0
100	112	21,7	4,0	79,5
100	215	11,3	2,2	63,0
100	147	13,3	2,0	55,1
		MW 14,8	**MW 2,2**	**MW 60,0**
		SD ±5,3	SD ±1,5	SD ±9,1
Magnetische Beads				
Blut (ml)	**PBMC (x 10^6)**	**Monozyten nach Depletion d0 (%)**	**Ausbeute von DCs am d10-d12 (%)**	**Anreicherung d.h. Prozent aller DCs am d10-d12 bezogen auf Monozyten nach Depletion (d0) (%) (%)**
200	260	11,5	2,6	67,0
170	222	25,0	6,7	86,0
100	110	5,4	0,5	61,0
100	116	7,8	1,6	54,0
100	123	6,0	0,4	80,0
100	154	4,1	0,8	79,0
100	109	18,5	3,3	82,0
100	115	4,0	1,5	83,0
100	198	3,5	2,0	75,0
100	201	8,3	2,7	87,0
		MW 9,4	**MW 2,2**	**MW 75,0**
		SD± 6,7	SD ±1,8	SD ±10,6

In Abb.17 wurden die Mittelwerte der Ausbeuten von DCs am d10-d12 graphisch als Säulendiagramm dargestellt. Man erkennt, daß von der Zahl aller anfänglich ausgesäten PBMC´s zwischen 2 und 3% nach 10 – 12 Tagen als DC geerntet werden konnten.

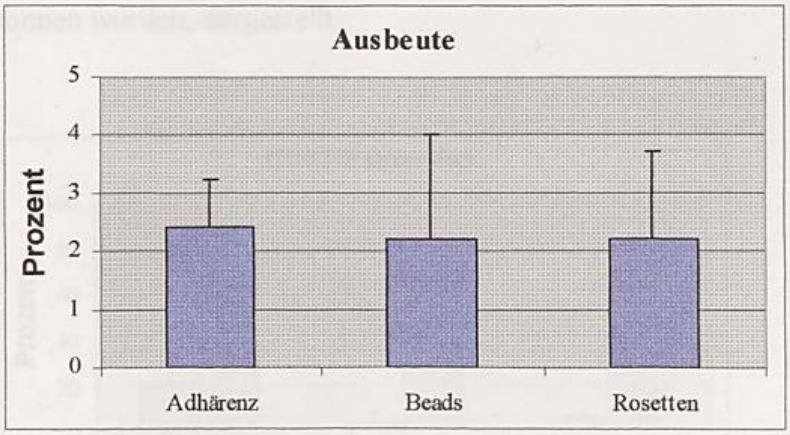


Abb.17: Mittelwerte der Ausbeute von unreifen und reifen dendritischen Zellen am d10-d12, die im FCS-freien System gewonnen wurden. Die Ausbeute wurde in Prozent dargestellt und die Standardabweichung wurde als Linie eingezeichnet. Die Prozentmengen beziehen sich auf die Zahl der Ausgangs-PBMC.

Bei der Anreicherung sieht man noch deutlicher als im FCS-haltigen System, daß die Adhärenzmethode die besten Ergebnisse erzielt (Abb.18).

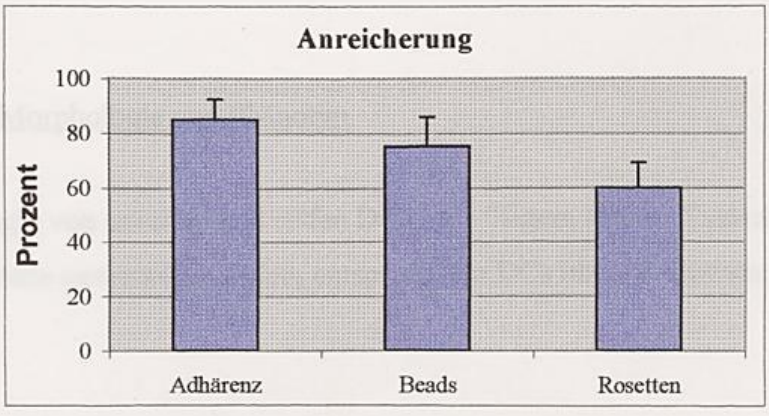


Abb.18: Mittelwerte der Anreicherung von unreifen und reifen dendritischen Zellen am d10-d12, die im FCS-freien System gewonnen wurden. Die Anreicherung wurde in Prozent dargestellt und die Standardabweichung wurde als Linie eingezeichnet.

Im autologen Plasmasystem konnte genauso wie im FCS-haltigen System bei der Gewinnung der dendritischen Zellen beobachtet werden, daß unreife DCs die mit der Adhärenzmethode gewonnen wurden größer, granulierter und mehr zytoplasmatische Ausstülpungen („veils") hatten, als DCs die mit anderen Methoden gewonnen wurden. In Abb.19 ist die CD83 Expression bei unreifen und reifen DCs, die mit unterschiedlichen Methoden gewonnen wurden, dargestellt.

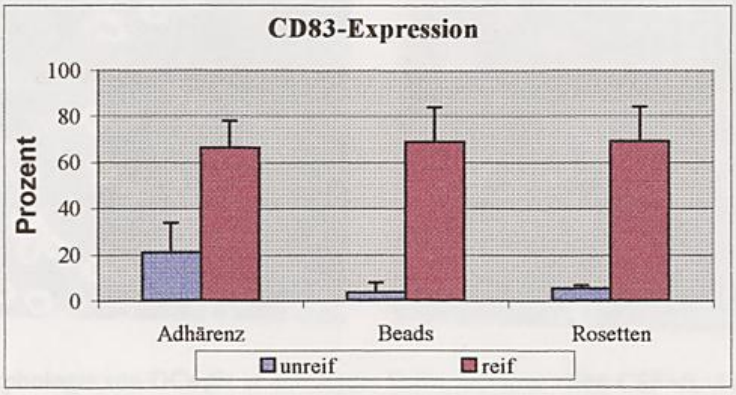


Abb.19: Vergleich der CD83 Expression bei unreifen und reifen DCs, die entweder mit der Adhärenzmethode, mit magnetischen Beads oder Neuraminidase-behandelten Schaferythrozyten im FCS-freien System gewonnen wurden. Die CD83 Expression wurde in Prozent dargestellt. Die Daten wurden mit Hilfe von FACS-scan Analysen gewonnen. Bei der Adhärenzmethode wurden 6 Versuche gemittelt, bei den magnetischen Beads und Neuraminidase-behandelten Schaferythrozyten jeweils 10 Versuche.

4.1.2.2. Morphologie und Phänotyp

Morphologie

Die Morphologie von unreifen und reifen DCs im 1 %igem Plasma System, die mit der Adhärenzmethode gewonnen wurden, entsprach den DCs im FCS-System (Abb.20).

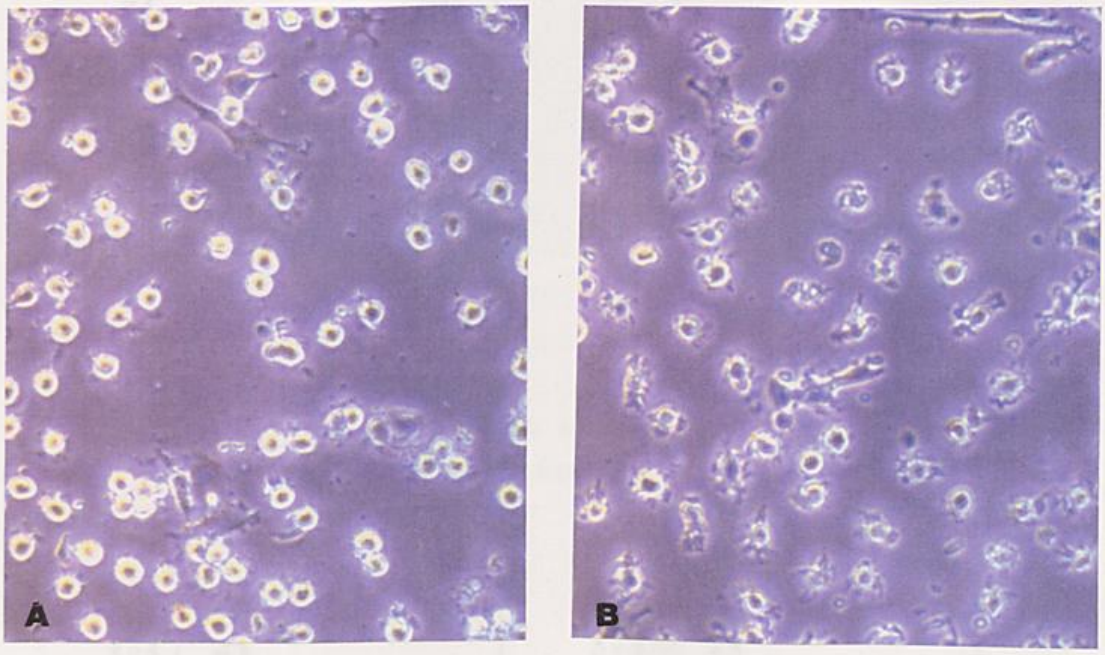


Abb.20: (A) Morphologie von DCs die in autologem Kulturmedium +GM-CSF+IL-4 mit der Adhärenzmethode kultiviert wurden = unreife DCs. (B) Morphologie von DCs in autologem Kulturmedium, die von d7 bis d10 MCM als Reifungsstimulus erhielten = reife DCs.

Phänotyp

Auch der Phänotyp der FCS-frei kultivierten dendritischen Zellen unterschied sich nicht von den Zellen im FCS-haltigen System (Abb.21). Einzig die CD83 Expression war im FCS-haltigen System im Durchschnitt um ca.10% höher.

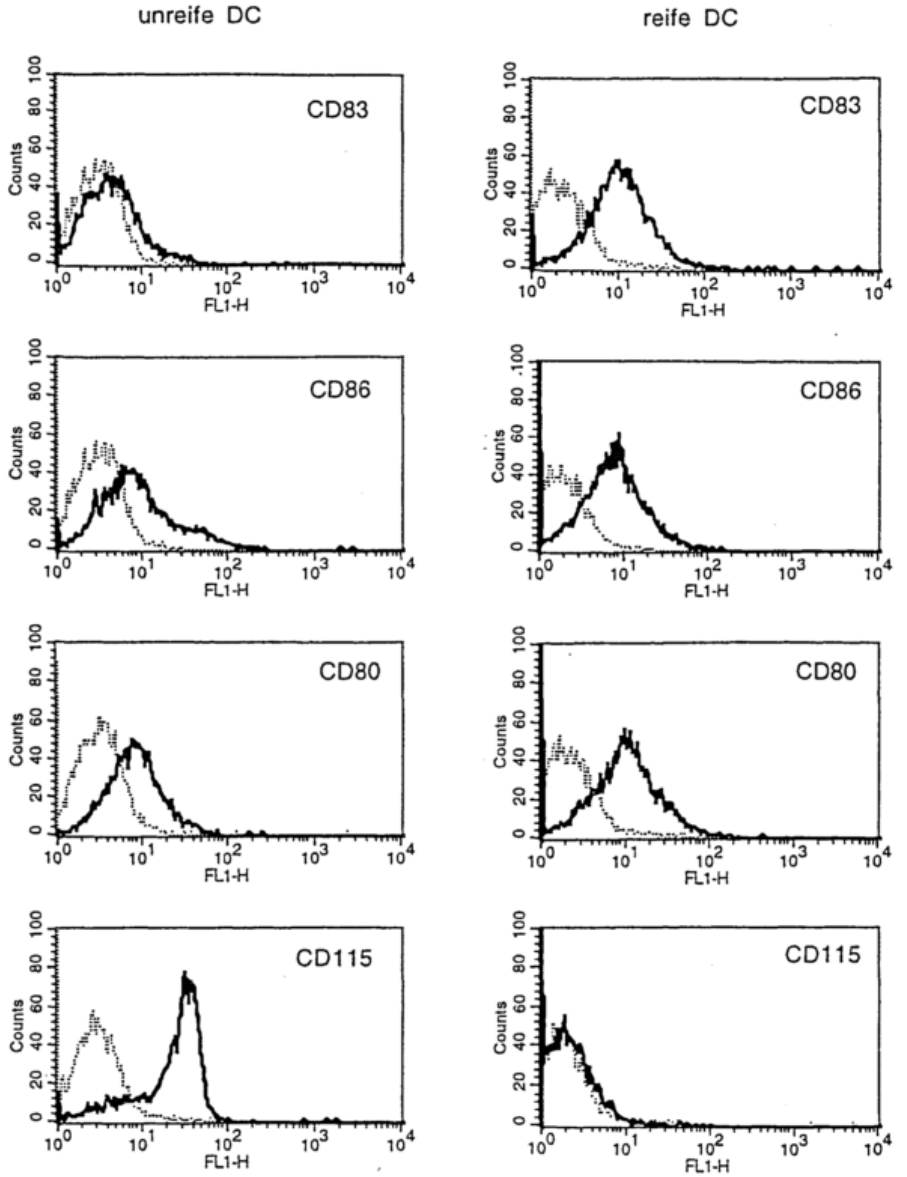


Abb.21: FACS-scan Analysen von dendritischen Zellen die mit autologem Kulturmedium+GM-CSF+IL-4 (unreife DCs) und mit autologem Kulturmedium+GM-CSF+IL-4 + **MCM** (reife DCs) kultiviert worden sind. Die Zellen wurden mit der Adhärenzmethode gewonnen. Die Histogramme der FACS-scan Analysen stellen im FSC/SSC gegateten Zellen dar. In jedem Histogramm sind die mAb (fette Linie) und die dazu passenden Isotypkontrollen (gepunktete Linie) eingezeichnet.

4.1.2.3. T Zell stimulatorische Funktion

Reife dendritische Zellen, die im autologen System mit der Adhärenzmethode gewonnen wurden, stimulierten ruhende T-Zellen besser als unreife dendritische Zellen. Dies entspricht dem bekannten Bild, daß reife DCs besser stimulieren als unreife dendritischen Zellen (Abb.22).

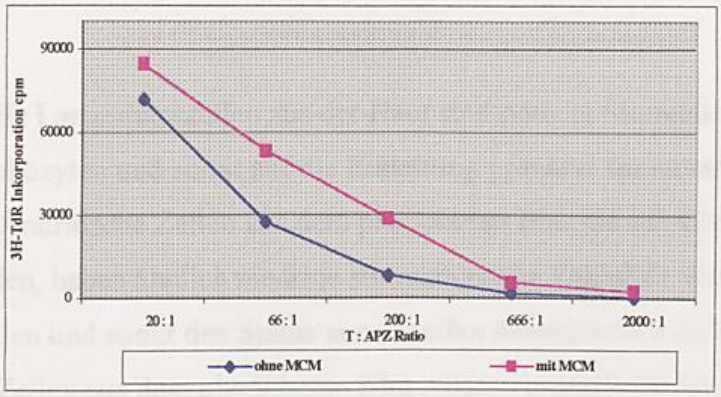


Abb.22: Immunostimulatorische Funktion von reifen (rot) und unreifen (blau) DCs, die mit der Adhärenzmethode gewonnen wurden. Diese Abbildung ist für 3 Versuche repräsentativ.

4.2. Analyse der Entwicklung und Reifung der dendritischen Zellen

Kultivierte, reife Langerhanszellen aus der Haut sind potente Stimulatoren ruhender, naiver T Lymphozyten und somit auf die Einleitung primärer Immunantworten spezialisiert. Dendritische Zellen aus dem pheripheren Blut die mit GM-CSF und IL-4 kultiviert werden, haben ähnlich niedrige stimulatorische Fähigkeit von frisch isolierten Langerhanszellen und somit den Status von unreifen dendritischen Zellen. Den unreifen dendritischen Zellen aus dem pheripheren Blut müssen zusätzliche Stimuli angeboten werden, um eine vollständige Reifung zu erzielen.

In diesem Kapitel werden unterschiedliche Stimulanzien, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten zugegeben wurden untersucht. Die Versuche wurden im FCS-haltigen System gemacht.

4.2.1. Einfluß der Kulturbedingungen während der frühen Kulturphase („priming culture")

4.2.1.1. Ersatz von Interleukin-4 durch Interleukin-13

Piemonti et al. (1995) zeigten, daß in der Kultur von unreifen dendritischen Zellen IL-4 durch IL-13 ersetzt werden kann. Piemonti fanden weder Unterschiede in der Morphologie der dendritischen Zellen, im Phänotyp noch in der MLR.
Auch in dieser Arbeit konnte morphologisch zwischen in GM-CSF + IL-4 und GM-CSF + IL-13 (20ng/ml) kultivierten Zellen kein Unterschied gefunden werden (Abb.23).

Morphologie

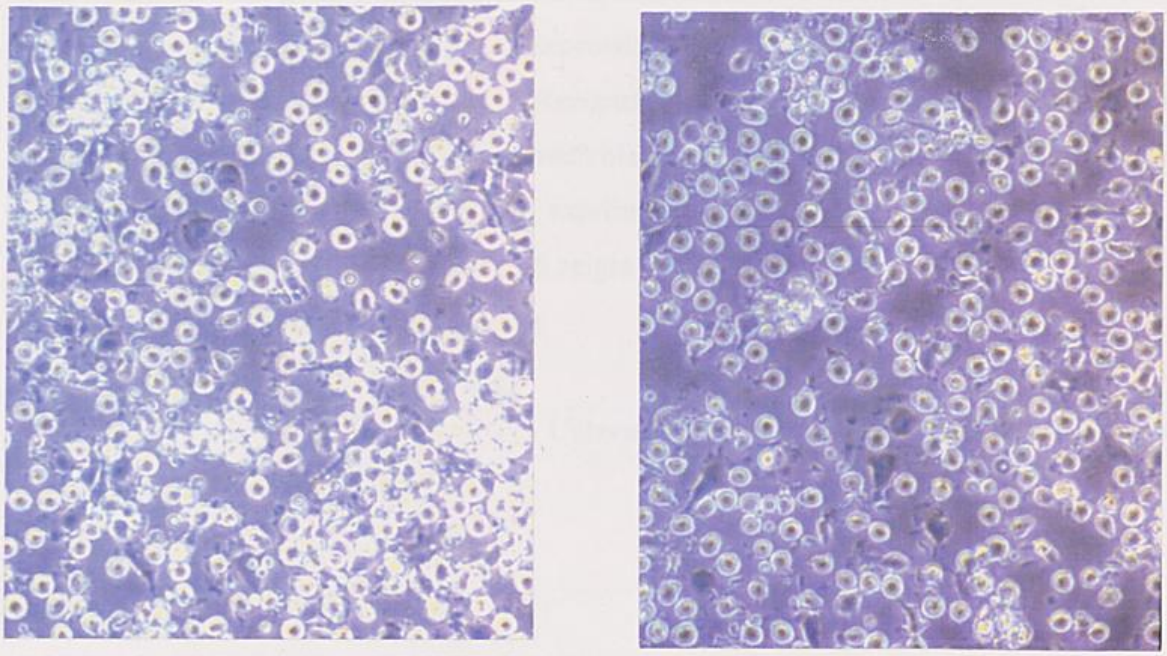


Abb.23: Dendritische Zellen die in GM-CSF + IL-4 kultiviert wurden am d7 (links), dendritische Zellen die in GM-CSF + IL-13 kultiviert wurden am d7 (rechts).

MLR

Auch die Fähigkeit allogene oder naive T-Zellen zu stimulieren, unterschied sich bei dendritischen Zellen, die in GM-CSF + IL-4 oder in GM-SCF + IL-13 kultiviert wurden nicht (Abb.24).

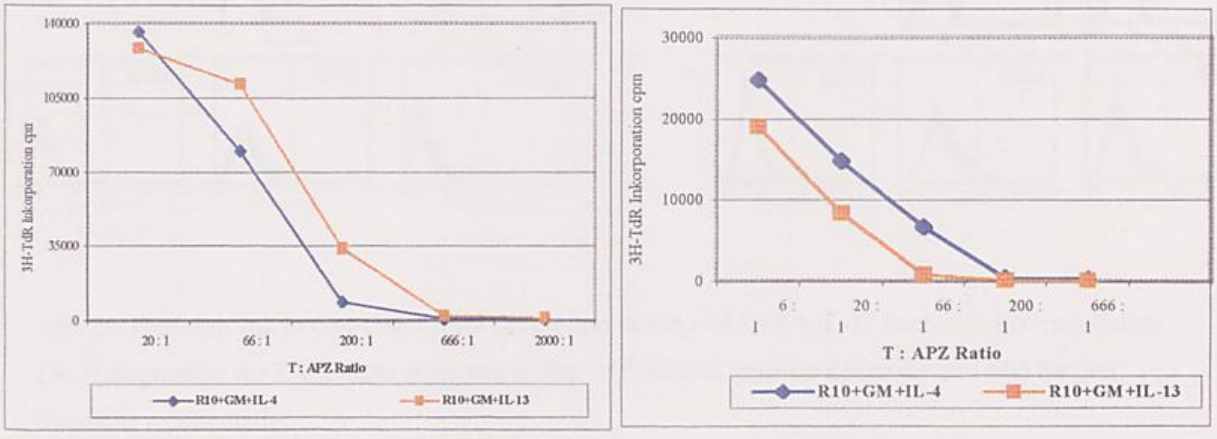


Abb.24: Immunostimulatorische Funktion von unreifen dendritischen Zellen die mit GM-CSF + IL-4 oder GM-CSF + IL-13 kultiviert wurden. In der Abbildung links wurden allogene T-Zellen verwendet, in der Abbildung rechts T-Zellen aus der Nabelschnur.

Phänotyp

In dieser Arbeit wurden Unterschiede im Phänotyp der unterschiedlich kultivierten dendritischen Zellen gefunden. Dendritische Zellen die in GM-CSF und IL-13 kultiviert wurden, zeigten eine geringere MHC II Expression, als DCs die in GM-CSF + IL-4 kultiviert wurden (Abb.25). Der M-CSF Rezeptor (CD115) wurde bei unreifen DCs, die in GM-CSF + IL-13 kultiviert wurden, schwach bis gar nicht exprimiert. Dendritische Zellen die in GM-CSF + IL-4 kultiviert wurden, exprimierten CD115 hingegen stark (Abb.25). Auf das kostimulatorische Molekül CD86 zeigte die unterschiedliche Kultivierungsmethode keine Auswirkung.

Aufgrund dieser phänotypischen Unterschiede wurden die dendritischen Zellen weiterhin in GM-CSF und IL-4 kultiviert.

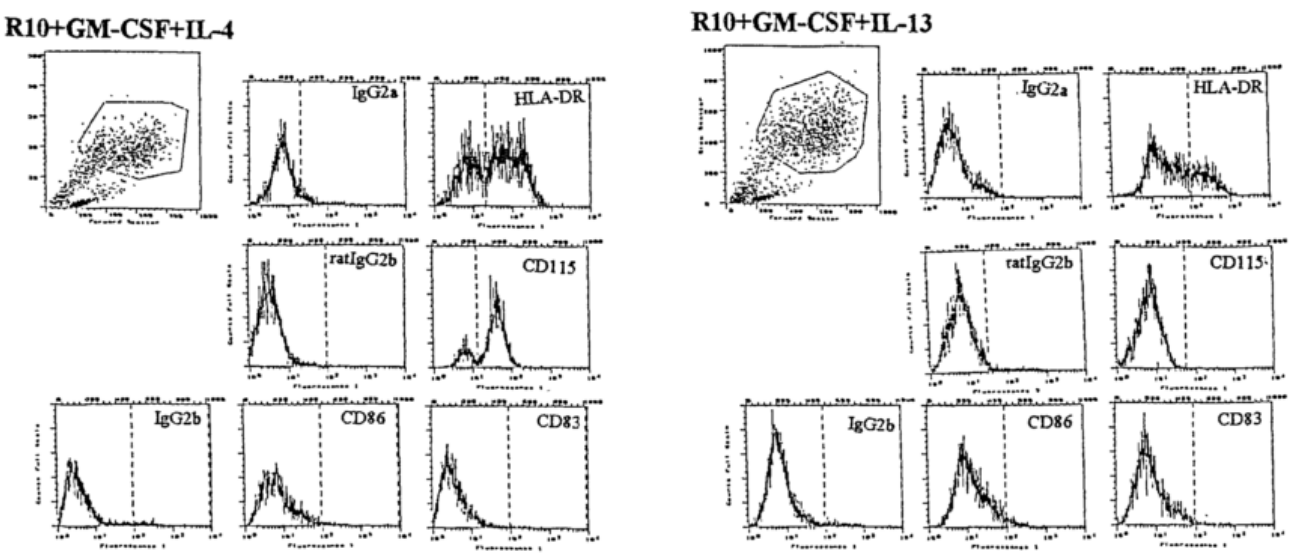


Abb.25: Phänotyp von in GM-CSF + IL-4 (links) und von in GM-CSF + IL-13 (rechts) kultivierten Zellen. Die Histogramme der FACS-scan Analysen stellen im FSC/SSC gegatete Zellen dar und sind für drei Versuche repräsentativ.

4.2.1.2. Zusatz von unterschiedlichen Zytokinen und Stimulantien

Ursprünglich wurde versucht, durch anfängliche Zugabe von zusätzlichen Stimuli zum GM-CSF + IL-4 eine Reifung zu induzieren (Tab.8). Stammzellfaktor (SCF, *c-kit*) und TNF-α wurden nur einmalig zu Beginn der Kultur zugegeben, die anderen Zytokine wurden jeden zweiten Tag mit neuem Medium zugesetzt („füttern"). Die so gewonnenen Zellen wurden morphologisch und auf ihre stimulatorischen Funktion untersucht (Abb.26).

Tab.8: Unterschiedliche Zytokincocktails, die verwendet wurden um eine Reifung zu induzieren. d0 = einmalige Zugabe zu Beginn der Kultur, d7 = einmalige Zugabe am siebten Kulturtag. GM-CSF wurde in einer Konzentration von 800 U/ml und IL-4 in einer Konzentration von 500 U/ml zugegeben. Die Kulturen wurden alle zwei Tage gefüttert und zwischen d10 und d12 ausgewertet. Diese Tabelle ist für 5 Versuche repräsentativ.

Zytokincocktail	**Morphologische Bestimmung der Reifung**	**Stimulatorische Fähigkeiten**
GM-CSF + IL-4 + d0 SCF (20ng/ml)	Zellen rund, ohne veils, viele adhärente Zellen, adhärente Cluster, unreif	Meist geringer als in GM-CSF + IL-4
GM-CSF + IL-4 + d0 TNF (50 U/ml)	Zellen rund, ohne veils, adhärente Zellen, schwimmende und adhärente Cluster, unreif	Immer geringer als in GM-CSF + IL-4
GM-CSF + IL-4 + IL-13 (d0, d2, d4, d6, d8, d10) (20 ng/ml)	Wie GM-CSF + IL-4, d.h. viele runde bis polymorphe schwimmende Zellen, schwimmende Cluster, unreif	Wenig bis kein Unterschied zu GM-CSF + IL-4
GM-CSF + IL-4 + IL-1ß (d0, d2, d4, d6, d8, d10) (50 U/ml)	Zellen polymorph, großteils schwimmend, eine Spur reifer als in GM-CSF + IL-4	Ähnlich wie GM-CSF + IL-4, etwas besser
GM-CSF + IL-4 + IL-15(d0, d2, d4, d6, d8, d10) (100 ng/ml)	Wie GM-CSF + IL-4, d.h. viele runde bis polymorphe schwimmende Zellen, schwimmende Cluster, unreif	Wenig bis kein Unterschied zu GM-CSF + IL-4
GM-CSF + IL-4 + IL-12 (d0, d2, d4, d6, d8, d10) (20 ng/ml)	Wie GM-CSF + IL-4, d.h. viele runde bis polymorphe schwimmende Zellen, schwimmende Cluster, unreif	Wenig bis kein Unterschied zu GM-CSF + IL-4
GM-CSF + IL-4 + d7 LPS (20 ng/ml)	Zellen polymorph, genoppt, teilweise adhärente und schwimmende Cluster, vermehrt tote Zellen (Apoptose?), teilweise reif	Besser als GM-CSF + IL-4 und die anderen Cocktails
GM-CSF + IL-4 + d7 SACS (1: 10000)	Zellen polymorph, nicht adhärent, sonnenförmig, zytoplasmatische Schleier, **reif!!**	Auffällig besser als GM-CSF + IL-4

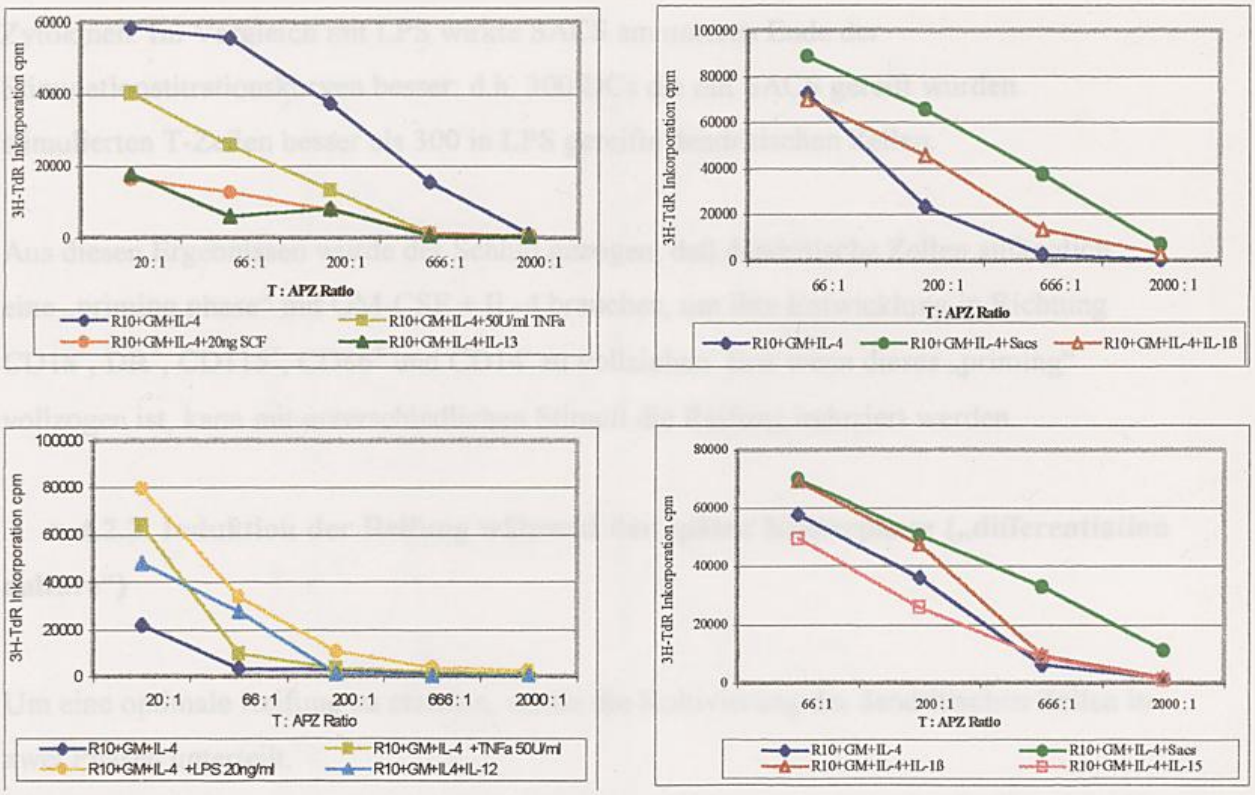


Abb.26: Immunostimulatorische Funktion von dendritischen Zellen, die mit unterschiedlichen Zytokinen kultiviert wurden. TNF-α und Stammzellfaktor (SCF) wurden einmalig am d0 zugegeben. IL-1β, IL-12, IL-13, IL-15 wurden am d0, d2, d6 und d8 zugegeben. LPS und SACS wurden einmalig am d7 zugegeben. Diese Abbildung ist für 5 Versuche repräsentativ.

Bei allen Versuchen bei denen am d0 zum GM-CSF + IL-4 einmalig Zytokine zugegeben wurden, reiften die dendritischen Zellen nicht. Durch die einmalige Zugabe von Stammzellfaktor (SCF) adhärierten die Zellen vermehrt und bildeten lange spindelförmige Vorläuferzellen aus. Die Zellen bildeten keine veils („Schleier“) und zeigten keine typischen DC-Morphologie. Alle anderen verwendeten Cocktails zeigten ebenfalls keine auffällige Wirkung. Auch die Stimulationsfähigkeit von T-Zellen zeigte keine wesentliche Verbesserung (Abb.26).

Durch die Zugabe von LPS am siebten Tag reiften die dendritischen Zellen teilweise. In einigen Versuchen trat ein vermehrtes Zellsterben auf. Allerdings steigerte sich im Vergleich zu den unreifen DCs die T-Zell-Stimulationsfähigkeit der reifen DCs (Abb.26) .

Einzig durch die Zugabe von SACS am siebten Tag kam es zu einer Ausbildung von veils und die Zellen ähnelten reifen Langerhanszellen. Die immunostimulatorische Funktion verstärkte sich signifikant und war in allen Fällen höher als durch Stimulation mit anderen

Zytokinen. Im Vergleich mit LPS wirkte SACS am unteren Ende der Stimulationstitrationskurven besser: d.h. 300 DCs die mit SACS gereift wurden stimulierten T-Zellen besser als 300 in LPS gereifte dendritischen Zellen.

Aus diesen Ergebnissen wurde der Schluß gezogen, daß dendritische Zellen anfänglich eine „priming phase" mit GM-CSF + IL-4 brauchen, um ihre Entwicklung in Richtung $CD1a^+$, DR^+, $CD115^+$, $CD86^{\pm}$ und $CD14^-$ zu vollziehen. Erst wenn dieses „priming" vollzogen ist, kann mit unterschiedlichen Stimuli die Reifung induziert werden.

4.2.2. Induktion der Reifung während der späten Kulturphase („differentiation culture")

Um eine optimale Reifung zu erzielen, wurde die Kultivierung der dendritischen Zellen in zwei Phasen unterteilt.
Der erste Kultivierungsschritt war die sogenannte „priming phase", in der die DCs von d0 bis d7 mit GM-CSF + IL-4 stimuliert wurden. Anschließend folgte eine „differentiation phase", in der einmalig am d7 der Reifungsstimulus zugegeben wurde. Hierzu wurden die DCs in neue 6-well-Platten übertragen. In weiteren Versuchen, als MCM als Reifungsstimulus verwendet wurde, bewährte es sich, die dendritischen Zellen in denselben 6-well-Platten zu lassen. So kam es zu einer Verringerung der Zelldichte, was sich positiv auf die Reifung der Zellen auswirkte (Thurnher et. al., 1997).
Mit der Entdeckung des spezifischen Reifungsmarkers CD83 (Zhou and Tedder, 1995) konnten endlich unreife von reifen dendritischen Zellen phänotypisch klar unterschieden werden. Ein Standardrepertoire der drei Antikörper CD86, CD83 und CD115 reichte, um unreife von reifen DCs phänotypisch zu unterscheiden (Abb.27). Erweitert wurde das Panel mit CD15s, CD45RO, CD45RA und CD80.

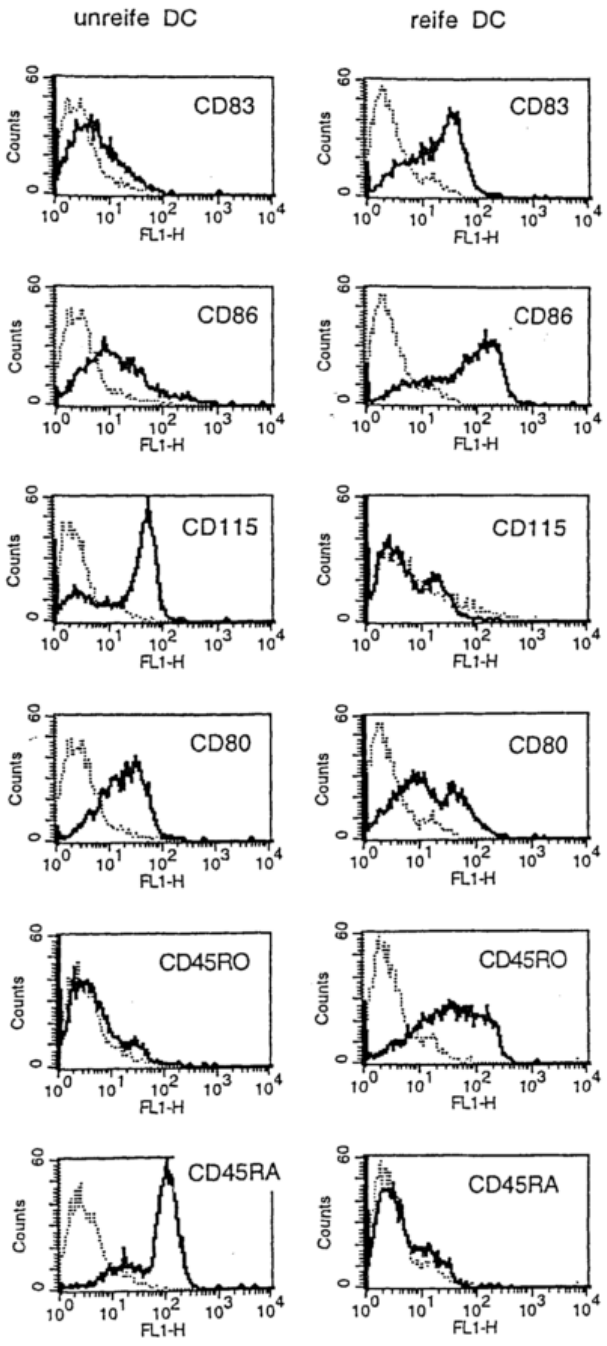


Abb.27: FACS-scan Analysen von unreifen (links) und in MCM gereiften (rechts) dendritischen Zellen. Die Abbildung ist für 16 Versuche repräsentativ. Die Histogramme der FACS-scan Analysen stellen im FSC/SSC gegatete Zellen dar (analog Abb.12 oder 25). In jedem Histogramm sind die mAb (fette Linie) und die dazu passenden Isotypkontrollen (gepunktete Linie) eingezeichnet.

Durch eine FACS-scan Zeitreihe wurde ermittelt, daß drei Tage „Reifungskultur" die maximal reifen DCs lieferten (Abb.28).

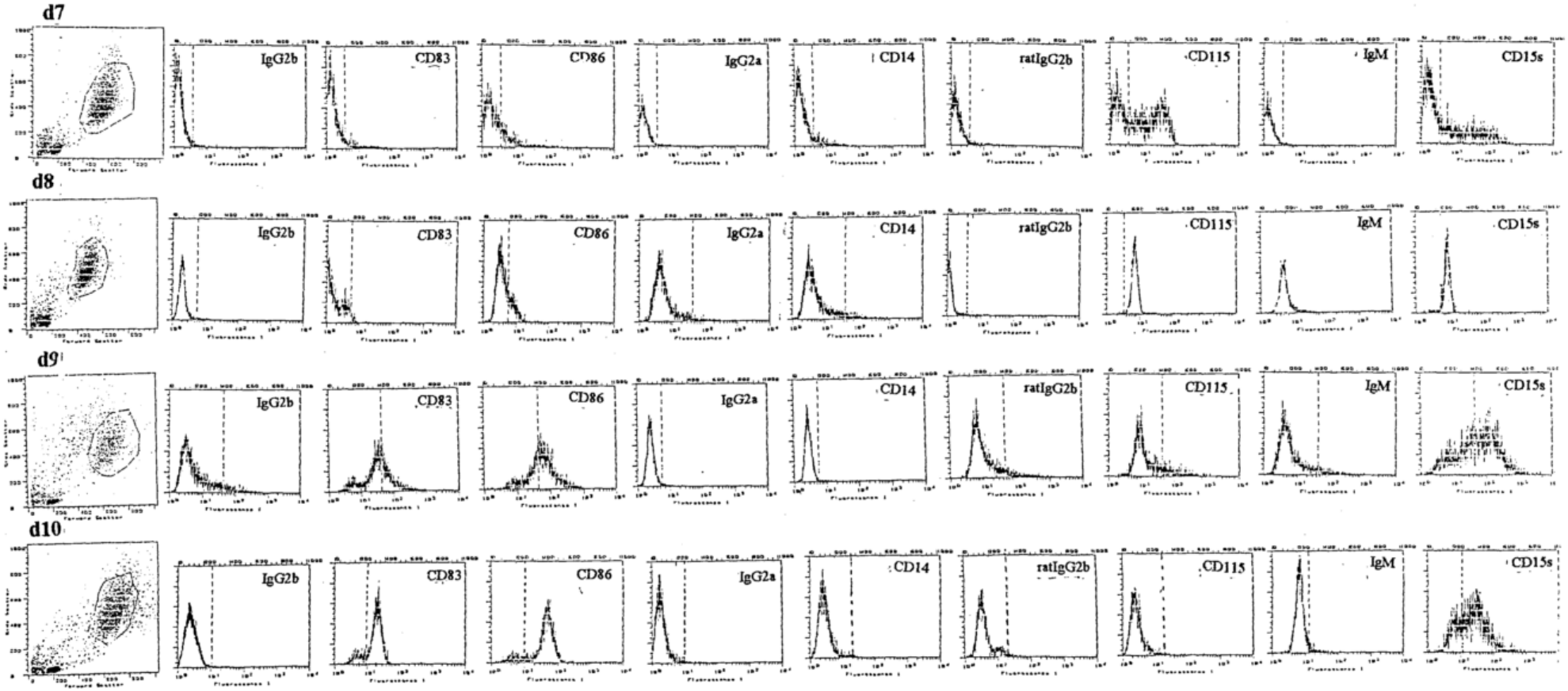


Abb.28; Zeitserie der „differentiation culture" von d7 bis d10. Die Abbildung ist für 4 Versuche repräsentativ. Die Histogramme der FACS-scan Analysen stellen im FSC/SSC gegatete Zellen dar.

4.2.2.1. Bakterielle Stimuli

Wie schon in Punkt (4.2.2.1.) aufgezeigt wurde, konnte SACS eine Reifung der dendritischen Zellen bewirken (Abb.29).

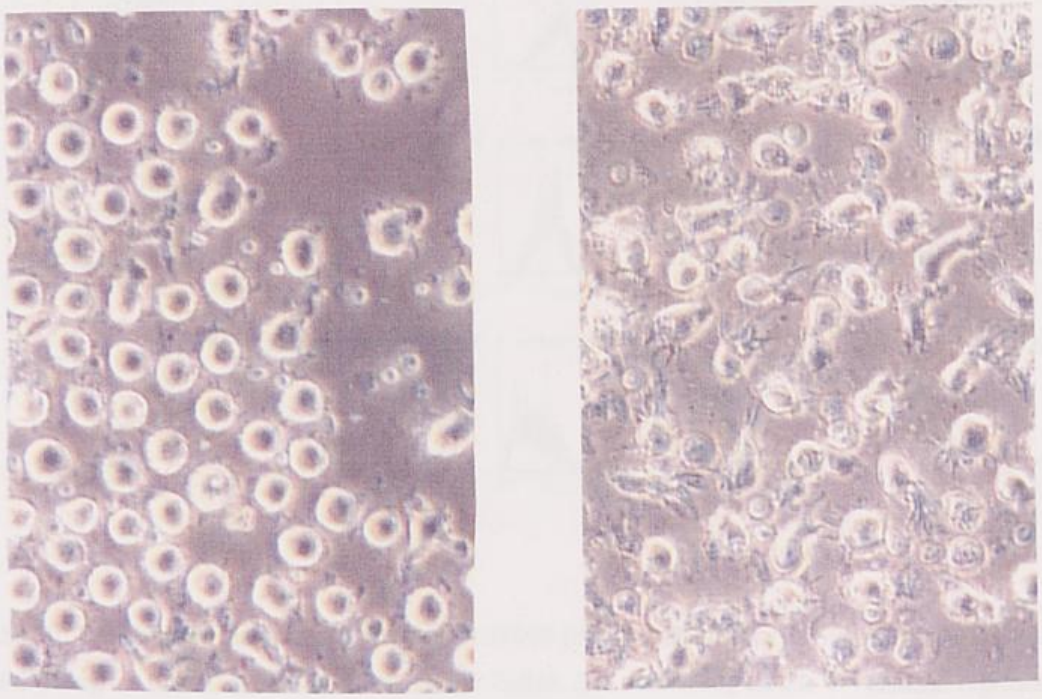


Abb.29: Morphologie von unreifen dendritischen Zellen, die in GM-CSF + IL-4 kultiviert wurden (links). Morphologie von reifen dendritischen Zellen, die von d0 – d9 in GM-CSF + IL-4 und drei weitere Tage mit SACS (1:10000) kultiviert wurden.

Außerdem wurde noch die bakteriellen Stimuli LPS und das Mycobakterium Bacillus Calmette Guérin (BCG) untersucht (Abb.30).

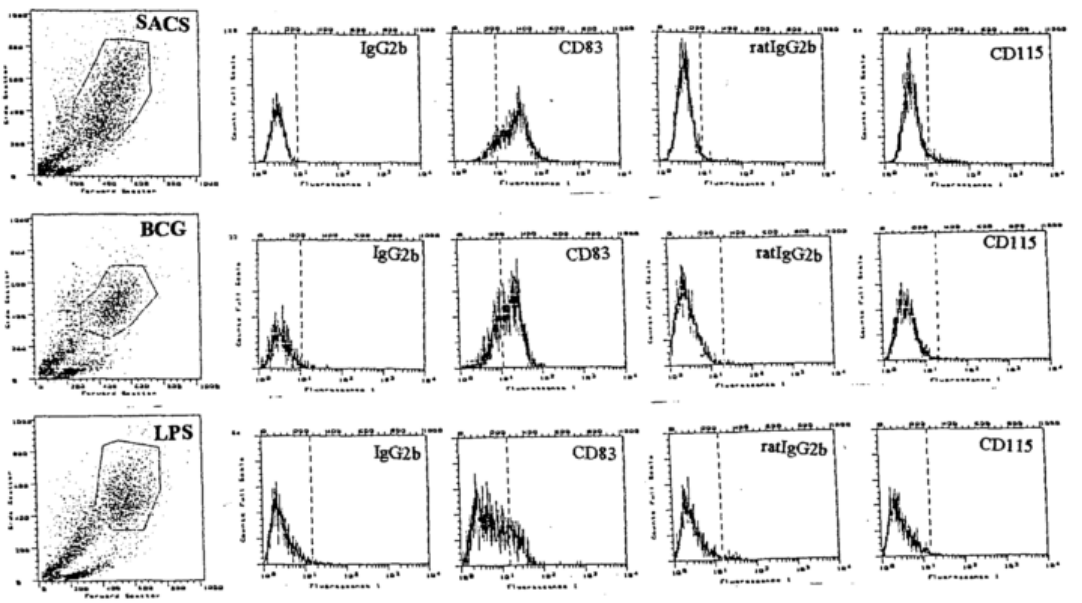
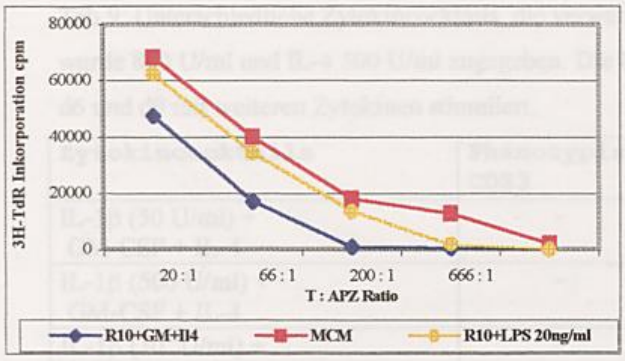


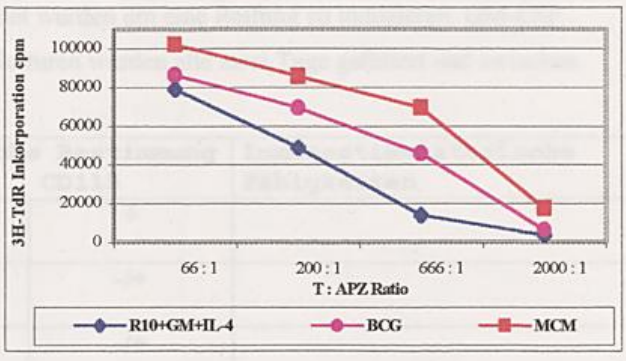
Abb.30: FACS-scan Analysen von in SACS 1:10000 (oben), BCG 6,25 x 10^7 Organismen/Well (Mitte) und LPS 20 ng/ml (unten) gereiften dendritischen Zellen. Die Abbildung ist für 4 Versuche repräsentativ. Die Histogramme der FACS-scan Analysen stellen im FSC/SSC gegatete Zellen dar.

Aus Abb.30 ist ersichtlich, daß sowohl SACS wie auch BCG eine komplette Reifung induzieren. Dendritische Zellen die in SACS oder BCG kultiviert wurden, exprimieren CD83 stark und CD115 nicht mehr.

Mit LPS konnte niemals eine vollständige Reifung erzielt werden und es kam sogar in einigen Versuchen zu einem vermehrten Zellsterben.

Die immunostimulatorische Funktion der mit SACS und BCG aktivierten Zellen (Abb.31) bestätigten die phänotypisch ermittelten Daten. Die mit LPS stimulierten Zellen zeigten eine bessere Stimulationsfähigkeit als dendritische Zellen die ausschließlich in GM-CSF + IL-4 kultiviert wurden, allerdings erreichten sie nicht ganz die immunostimulatorischen Fähigkeiten von vollständig ausgereiften Zellen (Abb31).





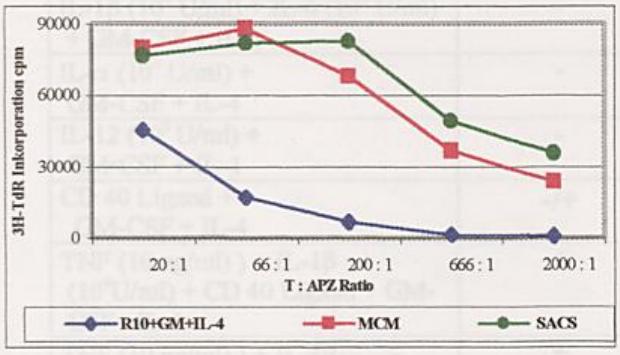


Abb.31: Immunostimulatorische Funktion von dendritischen Zellen die am d7 mit LPS, SACS und BCG stimuliert wurden im Vergleich mit in R10+GM-CSF+IL-4 und MCM. Die Messung erfolgte am d10 und ist für 3 Versuche repräsentativ.

4.2.2.2. Definierte Cocktails verschiedener Zytokine

Durch den bakteriellen Stimulus von SACS und BCG kam es zu einer vollständigen Reifung der dendritischen Zellen.

Als nächstes wurde versucht, den bakteriellen Stimulus durch einen Zytokincocktail zu ersetzten.

Die Kulturen wurden während der ersten 6 bis 9 Tage mit GM-CSF + IL-4 stimuliert und anschließend folgte eine dreitägige Differenzierungsphase mit dem jeweiligen Zytokin oder Zytokincocktail.

Tab.9: Unterschiedliche Zytokincocktails, die verwendet wurden um eine Reifung zu induzieren. GM-CSF wurde 800 U/ml und IL-4 500 U/ml zugegeben. Die Kulturen wurden alle zwei Tage gefüttert und zwischen d6 und d9 mit weiteren Zytokinen stimuliert.

Zytokincocktails	Phänotypische Bestimmung CD83	CD115	Immunostimulatorische Fähigkeiten
IL-1β (50 U/ml) + GM-CSF + IL-4	-	+	
IL-1β (500 U/ml) + GM-CSF + IL-4	-	-/+	
IL-1β (10^4 U/ml) + GM-CSF + IL-4	-	-/+	
IL-1β (10^4 U/ml) + IL-6 (10^4 U/ml) + GM-CSF + IL-4	-	-/+	
IL-α (10^4 U/ml) + GM-CSF + IL-4	-	+	Nicht gemacht
IL-12 (10^3 U/ml) + GM-CSF + IL-4	-	+	
CD 40 Ligand + GM-CSF + IL-4	-/+	-	
TNF (10 ng/ml)) + IL-1β (10^4U/ml) + CD 40 Ligand + GM-CSF+ IL-4	+	-	
TNF (10 ng/ml)) + IL-1β (10^4 U/ml) + IL-6 (10^4 U/ml) + GM-CSF+ IL-4	+	-	Nicht gemacht
TNF (1 ng/ml) + GM-CSF + IL-4	-	-/+	
TNF (20 ng/ml) + GM-CSF + IL-4	+	-	

Aus Tab.9 ersieht man, daß mit allen Zytokincocktails, denen TNF (≥ 10 ng/ml) beigemengt wurde die Reifung der dendritischen Zellen induzieren werden konnte. Jedoch bereits TNF-α (10 ng/ml) allein induzierte eine vollständige Reifung. Mit CD40-Ligand + GM-CSF + IL-4 konnte eine teilweise Reifung induziert werden.

Die immunostimulatorischen Fähigkeiten von dendritischen Zellen die mit den unterschiedlichen Zytokincocktails aktiviert wurden, unterschieden sich untereinander nur schwach, egal ob sie vollständig oder nur teilweise gereift waren (Abb.32). In GM-CSF + IL-4 kultivierte Zellen (unreife) stimulierten immer schwächer als reife dendritische Zellen. Die besten stimulatorische Fähigkeiten hatten immer noch dendritische Zellen die mit SACS, BCG oder MCM gereift wurden.

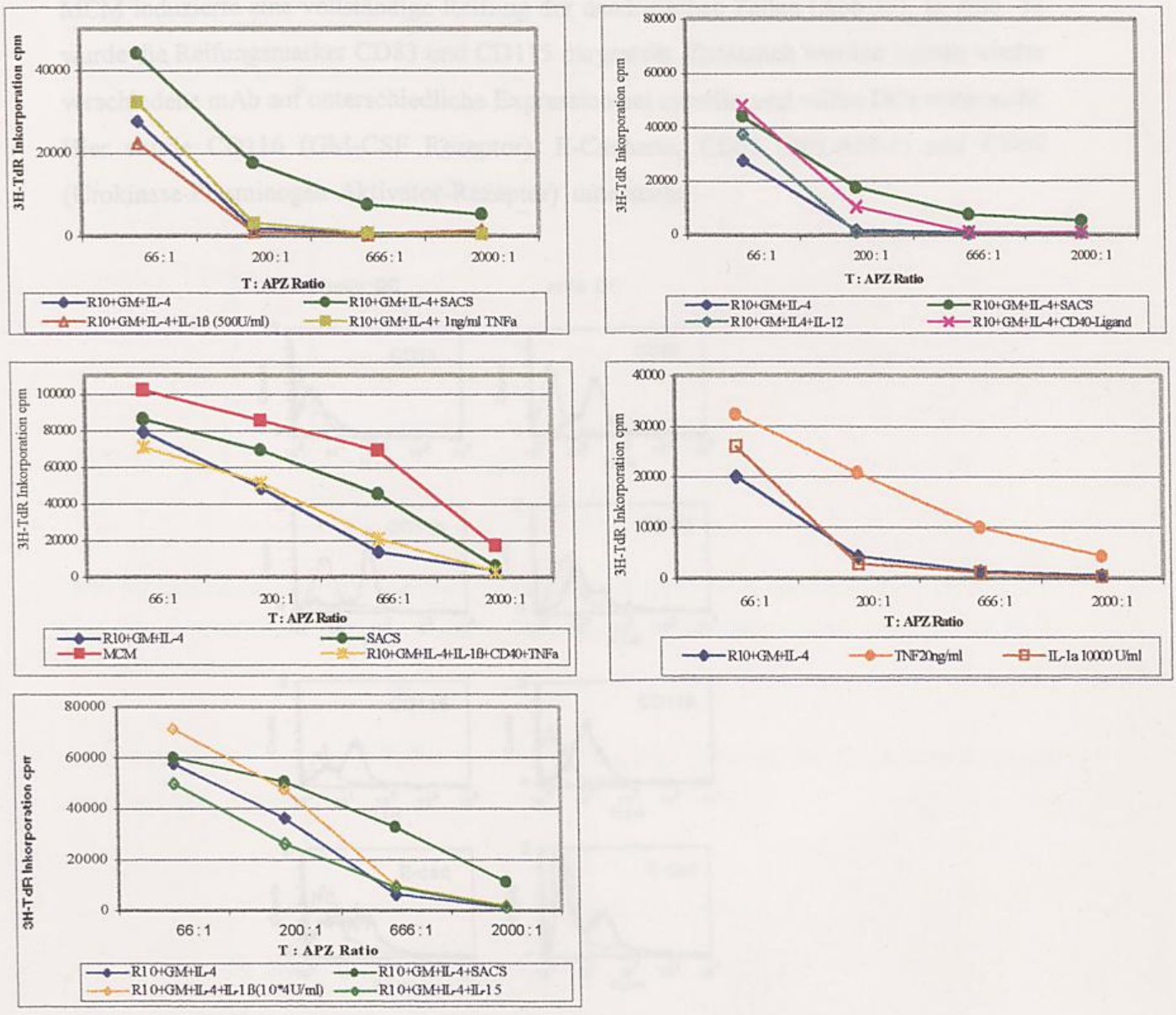


Abb.32: Immunostimulatorische Funktion von dendritischen Zellen, die am d7 mit unterschiedlichen Zytokinen oder SACS oder MCM stimuliert wurden und drei weitere Tage inkubierten (differentiation culture). Diese Abbildung ist für 4 Versuche repräsentativ.

4.2.2.3. Monozyten-konditioniertes Medium (MCM) als natürlicher Zytokincocktail

Monozyten-konditioniertes Medium (MCM) induziert optimale Reifung

Die besten Ergebnisse zur Reifung der dendritischen Zellen wurde mit SACS, einem bakteriellen Stimulus erreicht. Auch TNF-α scheint eine vollständige Reifung zu bewirken. Nun wurde versucht mit Monozyten-konditionierten Medien (MCM) eine Reifung zu induzieren.

Phänotyp

MCM induzierte eine vollständige Reifung der dendritischen Zellen (Abb.33). In Abb. 33 wurde die Reifungsmarker CD83 und CD115 dargestellt. Zusätzlich wurden immer wieder verschiedene mAb auf unterschiedliche Expression bei unreifen und reifen DCs untersucht. Hier wurde CD116 (GM-CSF Rezeptor), E-Cadherin, CD31 (PECAM-1) und CD87 (Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor) untersucht.

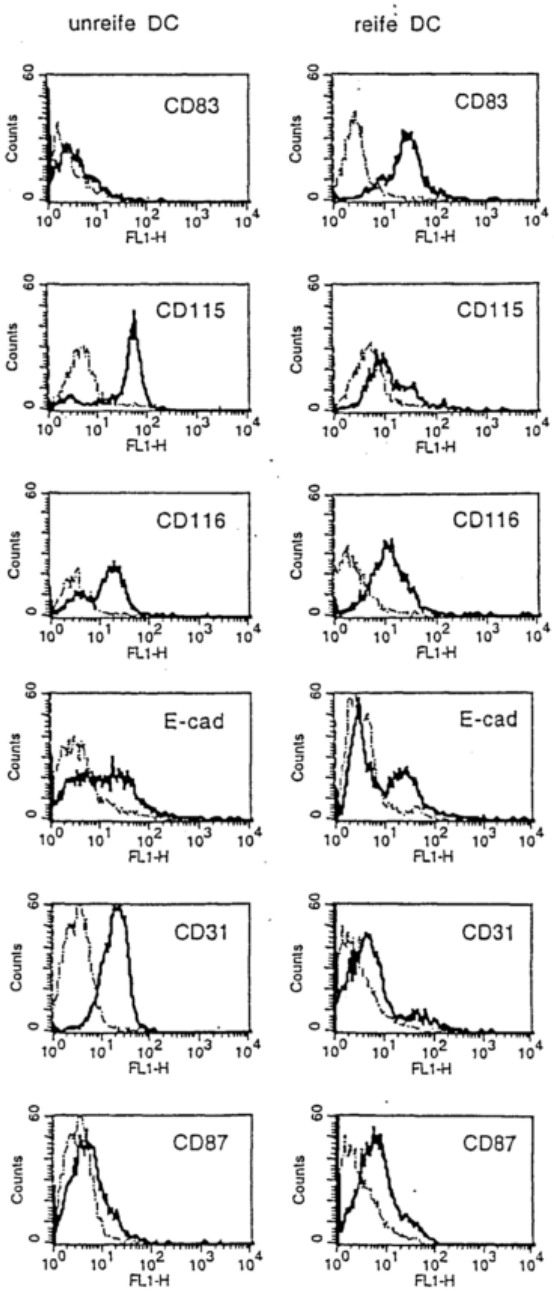


Abb.33: FACS-scan Analysen von unreifen (links) und reifen (rechts) dendritischen Zellen. Die Abbildung ist für 7 Versuche repräsentativ. Die Histogramme der FACS-scan Analysen stellen im FSC/SSC gegatete Zellen dar. In jedem Histogramm sind die mAb (fette Linie) und die dazu passenden Isotypkontrollen (gepunktete Linie) eingezeichnet.

MLR

In der MLR konnte gezeigt werden, daß MCM die T-Zellstimulatorische Fähigkeit von dendritischen Zellen genauso gut bis besser stimulierte als SACS (Abb. 34).

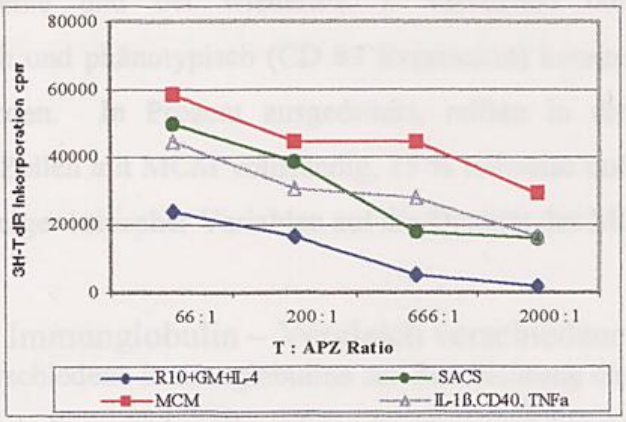


Abb. 34: Immunostimulatorische Fähigkeit von dendritischen Zellen die in GM-CSF + IL-4, MCM, SACS und dem Zytokincocktail TNF-α + IL-1β + CD40-Ligand gereift wurden. Diese Abbildung ist für 4 Versuche repräsentativ.

Mit ungeprägten, naiven T-Zellen aus der Nabelschnur konnten die Ergebnisse bestätigt werden (Abb. 35)

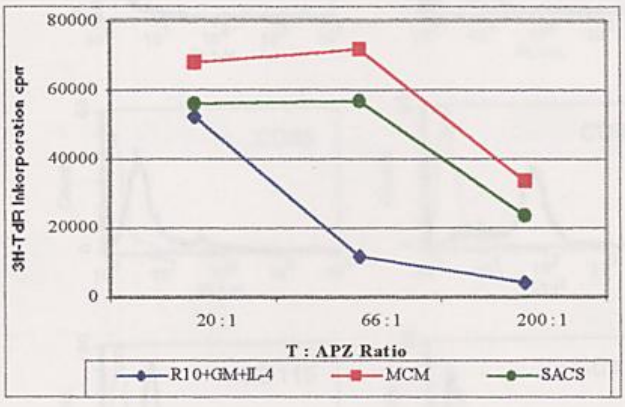


Abb.35: Immunostimulatorische Fähigkeiten von dendritischen Zellen die mit R10+GM-CSF+IL-4, MCM und SACS kultiviert wurden. Die DCs wurden mit T-Zellen aus der Nabelschnur stimuliert. Diese Abbildung ist für 3 Versuche repräsentativ.

Aus diesen Daten kann geschlossen werden, daß MCM der optimale Stimulus ist, um dendritische Zellen zur Reifung zu bringen.

Kritische Parameter „MCM ist nicht MCM"

Monozyten-konditioniertes Medium zeigte in manchen Fällen eine Instabilität, d.h. es konnte keine morphologische und phänotypische Reifung der dendritischen Zellen induziert werden. Von insgesamt 47 ausgewerteten Versuchen induzierte MCM bei 7 Versuchen keine und bei wiederum 7 Versuchen nur eine teilweise Reifung. Morphologisch und phänotypisch (CD 83 Expression) konnte keine vollständige Reifung bestimmt werden. In Prozent ausgedrückt, reiften in diesen Versuchen 70 % der dendritischen Zellen mit MCM vollständig, 15 % teilweise und 15 % nicht. Deshalb wurde der Einfluß einiger kritischer Variablen auf die Qualität des MCM systematisch untersucht.

Einfluß von Immunglobulin – Vergleich verschiedener Immunglobuline

Es wurden verschiedene Immunglobuline zur Beschichtung der Petrischalen ausgetestet. Alle Immunglobuline wurden aliquotiert, eingefroren und in einer Endkonzentration von 100 µg/ml eingesetzt.

Immunglobulin **Humanes Gammaglobulin** (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA) produzierte konstant gut funktionierendes MCM, das die Reifung der dendritischen Zellen bewirkte (Abb.36).

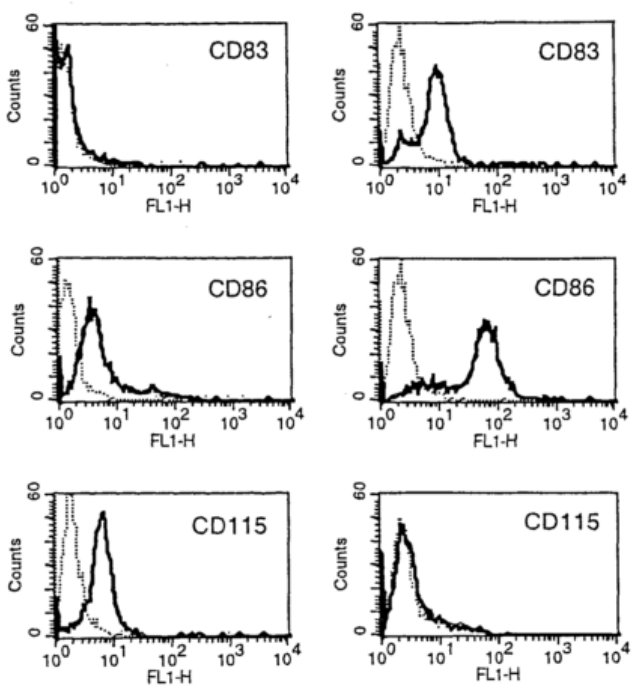
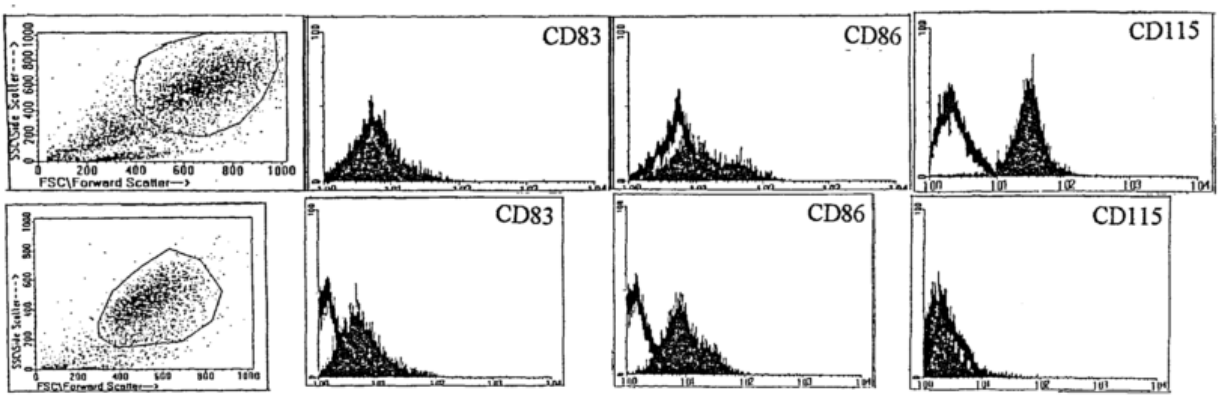


Abb.36: FACS-scan Analysen von unreifen (links) und reifen (rechts) dendritischen Zellen. Die Abbildung ist für 10 Versuche repräsentativ. Die Histogramme der FACS-scan Analysen stellen im FSC/SSC gegatete Zellen dar. In jedem Histogramm sind die mAb (fette Linie) und die dazu passenden Isotypkontrollen (gepunktete Linie) eingezeichnet.

Monomeres 7s-IgG (Biochemie GmbH., Wien, A) war chargenabhängig, genauso wie **Endobulin**, humanes Immunglobulin zur intravenösen Anwendung (Immuno AG, Wien, A).

Die CD83 Expression und die T-Zell-Stimulationsfähigkeit der unreifen und reifen dendritischen Zellen ist unterschiedlich (Abb.37). Nicht jedes MCM, das mit diesen zwei Immunglobuline produziert wurde, induzierte eine Reifung.

Biochemie



Endobulin

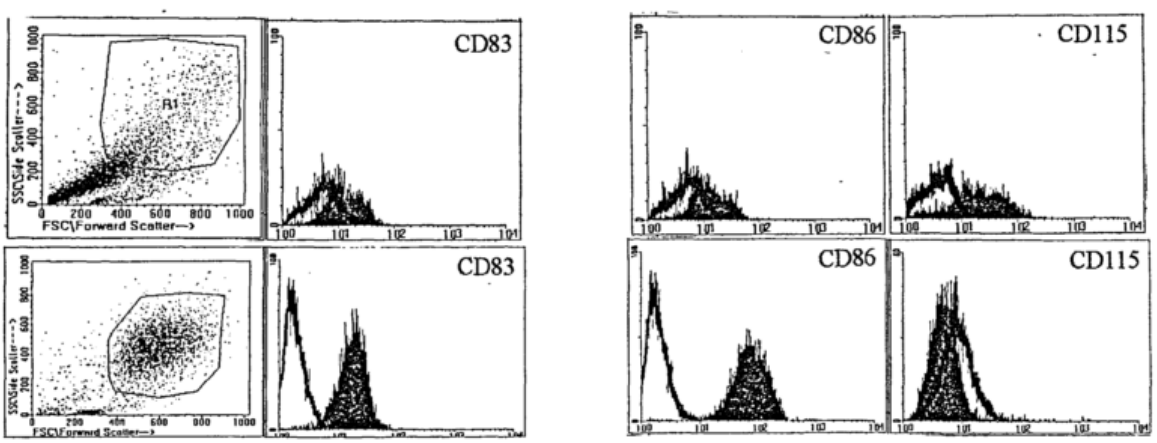


Abb.37a: : FACS-scan Analysen von dendritischen Zellen, die mit MCM stimuliert wurden, das mit Monomerem 7s-IgG (oberen 2 Reihen) und Endobulin (unteren 2 Reihen) hergestellt wurde. Die jeweilige erste Reihe stellt die CD83 und CD86 und CD115 Expression von DCs dar, die mit MCM nicht reiften. Die zweite Reihe zeigt DCs die mit MCM stimuliert wurden, das mit dem gleichen Immunglobulin, allerdings einer **anderen Charge** hergestellt wurde. Die Abbildung ist für 3 Versuche repräsentativ. Die Histogramme der FACS-scan Analysen stellen im FSC/SSC gegatete Zellen dar. In jedem Histogramm sind die mAb (volle, graue Peaks) und die dazu passenden Isotypkontrollen (schwarze Linie) eingezeichnet.

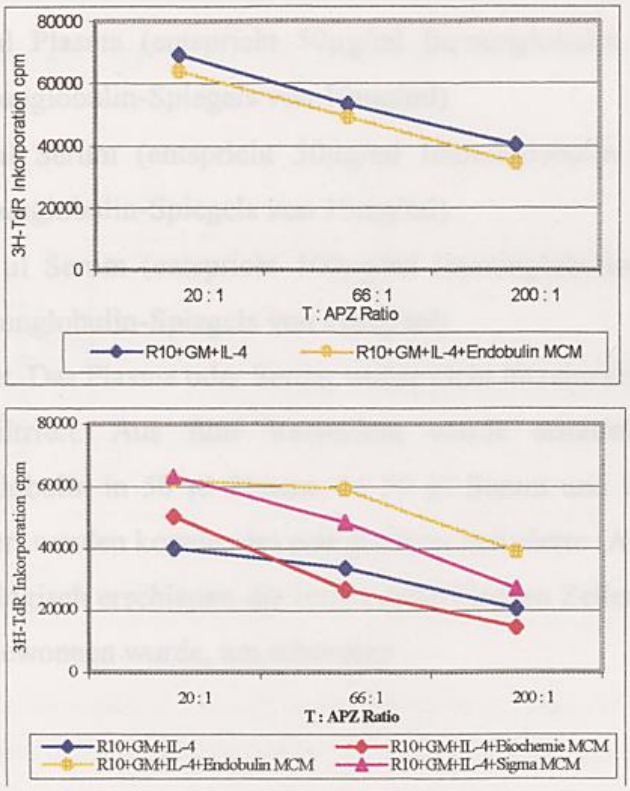


Abb.37b: Immunostimulatorische Funktion von dendritischen Zellen, die mit unterschiedlichen MCMs, zu deren Herstellung chargenunterschiedliche Immunglobuline verwendet wurden, kultiviert wurden. Diese Abbildung ist für 3 Versuche repräsentativ.

In der oberen Graphik der Abb.37b wurde Endobulin zum Beschichten der MCM-Platten verwendet. Die Inkubation mit diesem MCM zeigte keine immunostimulatorische Verbesserung der T-Zellaktivierung im Vergleich zu unreifen (R10+GM-CSF+IL-4) dendritischen Zellen. In der unteren Graphik wurde Endobulin einer anderen Charge verwendet. Hier kam es zu einer Reifung der DCs. Im selben Versuch wurde auch MCM zu dessen Herstellung Humanes Gammaglobulin von Sigma und Monomeres 7s-IgG von Biochemie verwendet wurde, abgebildet.

Einfluß des Immunglobulins – Etablierung einer Modifikation mit autologem Ig

Da **Humanes Gammaglobulin** (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA) nicht klinisch verwendbar ist (d.h. im Rahmen von Immuntherapien mit gezüchteten DCs), wurde versucht ein stabiles MCM mit spendereigenem Immunglobulin zu erzeugen. Als Quelle für das Immunglobulin wurde einfach das Serum oder das Plasma des Blutspenders verwendet.

Die Petrischalen wurden mit 10 ml PBS inkubiert und es wurden jeweils

- 50 µl Plasma (entspricht 50µg/ml Immunglobulin unter der Annahme eines Immunglobulin-Spiegels von 10mg/ml)
- 50 µl Serum (entspricht 50µg/ml Immunglobulin unter der Annahme eines Immunglobulin-Spiegels von 10mg/ml)
- 100 µl Serum (entspricht 100µg/ml Immunglobulin unter der Annahme eines Immunglobulin-Spiegels von 10mg/ml)

zugesetzt. Das Plasma oder Serum wurde nicht hitzeinaktiviert und mit einem 0,8 µm Filter filtriert. Aus fünf Versuchen wurde ermittelt, daß sowohl mit dem Immunglobulin in 50 µl Plasma, in 50 µl Serum und in 100 µl Serum ein MCM produziert werden konnte, das eine Reifung induzierte (Abb.38).

Morphologisch erschienen die reifen dendritischen Zellen im MCM, daß mit 100 µl Serum gewonnen wurde, am schönsten.

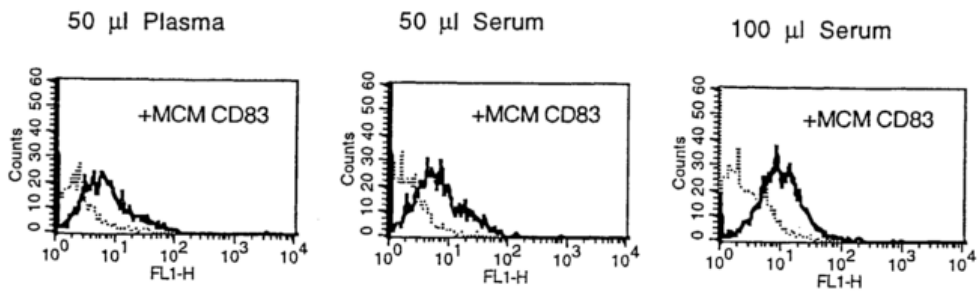


Abb.38: FACS-scan Analysen von dendritischen Zellen die mit MCM stimuliert wurden, das mit spendereigenem Immunglobulin hergestellt wurde. Die Abbildung ist für 4 Versuche repräsentativ. Die Histogramme der FACS-scan Analysen stellen im FSC/SSC gegatete Zellen dar. In jedem Histogramm sind die mAb (fette Linie) und die dazu passenden Isotypkontrollen (gepunktete Linie) eingezeichnet.

Auch in der MLR konnte die bessere Stimulationsfähigkeit von dendritischen Zellen gezeigt werden, die mit MCM mit „eigenem“ Immunglobulin stimuliert worden sind (Abb.39).

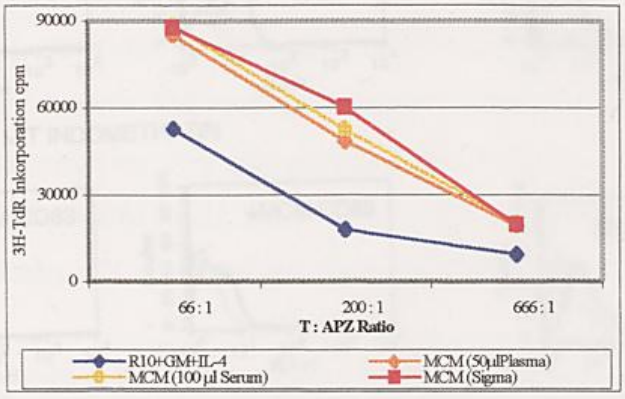


Abb.39: Immunostimulatorische Fähigkeiten von dendritischen Zellen die mit MCM stimuliert wurden, das mit spendereigenem Immunglobulin hergestellt wurde. Diese Abbildung ist für 2 Versuche repräsentativ.

Einfluß der Prostaglandine

Indomethazin ist ein nicht steroidales Antiphlogistikum, das die Prostaglandinsynthese hemmt. Es wurde bei der MCM Produktion dem Kulturmedium mit 100 µg/ml beigemengt.

In Gegenwart von Indomethazin produziertes MCM zeigte keinen konstanten Einfluß auf die Reifung der dendritischen Zellen. In drei Experimenten konnte Indomethazin einmal die CD83 Expression der in MCM und TNF kultivierten DCs hemmen (Abb.40) und in zwei weiteren Fällen nicht. Den Ursachen für diese Variabilität wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter nachgegangen.

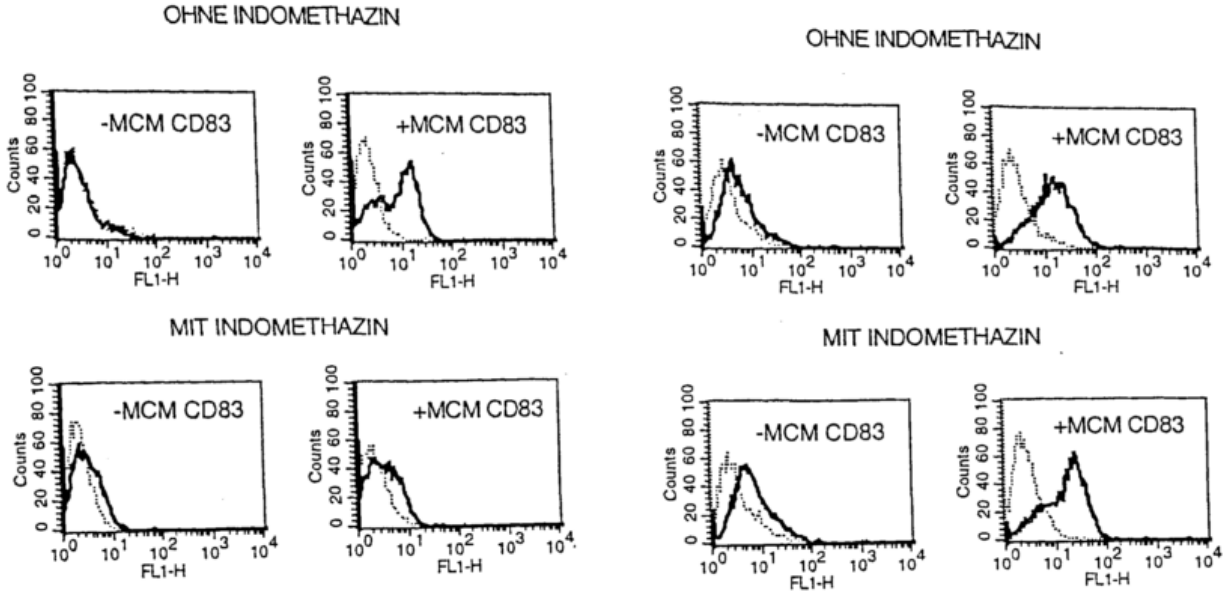


Abb.40: In dieser Abbildung sind 2 Versuche abgebildet (linkes Viererpanel, rechtes Viererpanel). Beim linken Viererpanel hemmte Indomethazin die CD83 Expression. Im rechten Viererpanel konnte kein Einfluß des Indomethazins auf die CD83 Expression festgestellt werden.

Analyse der Zusammensetzung des Monozyten-konditionieren Mediums

Mit Hilfe von ELISA wurden die Mengen von TNF-α, IL-1β, IL-12, IL-10 und Nitrit im MCM bestimmt. In Tab.10 werden MCMs die einer Reifung und MCMs die keine Reifung induzieren konnten dargestellt.

Tab.10: Zytokinproduktion im FCS-haltigem MCM. N = Negativ, d.h. unter der Nachweisgrenze des ELISAs

Versuchs-nummer	**TNF pg/ml**	**IL-1β pg/ml**	**IL-12 pg/ml**	**IL-10 pg/ml**	**Nitrit µM**	**CD83 Expression**
Nachweis-grenze	*10pg/ml*	*10pg/ml*	*20pg/ml*	*5pg/ml*	*1µM*	
231	186	5200	N	58	7,1	70%
236	286	5000	N	N	4,2	45%
238	5000	286	N	176	4,2	45%
245	4800	18000	N	180	2,7	80%
248	400	16000	N	N	2,5	75%
249	400	14000	N	N	4,2	76%
256	4200	12000	N	153	16,6	80%
263	74	450	N	N	1,7	50%
267	584	1290	N			80%
232	3600	16000	17	152	4,2	<10%
255	152	210	N	N		<10%
256	0	162		N	3,9	<10%
260	67	<10	N	N	3,3	<10%
268	42	72		N	1,9	<10%

Aus Tab.10 ersieht man, daß „funktionierende" MCMs viel IL-1β und TNF-α enthielten. Zwei MCMs (236, 263) enthielten wesentlich weniger dieser beiden Zytokine und induzierten ca. 50 % CD83 Expression. Genauso wie MCM 238, das zwar 5000 pg/ml TNF enthielt allerdings nur 286 pg/ml IL-1β. Auch wurde in diesem MCM die größte Menge IL-10 produziert (180 pg/ml).

Die MCMs mit einer < 10 % CD83 Expression produzierten kaum TNF und IL-1β. Das MCM aus Versuch 232 war die einzige Ausnahme, trotz hoher TNF und IL-1β Produktion, zeigte sich nur eine sehr geringe CD83 Expression (< 10 %). Allerdings wurde in 232 als einzigem MCM IL-12, wenn auch in sehr kleiner Menge (17 pg/ml), produziert.

Das produzierte Nitrit korrelierte nicht mit der Qualität der MCMs.

Tab.11: Zytokinproduktion im FCS-freien System. N = Negativ, d.h. unter der Nachweisgrenze des ELISAs

Versuchs-nummer	TNF pg/ml	IL-1β pg/ml	IL-12 pg/ml	IL-10 pg/ml	Nitrit µM	CD83 Expression
Nachweis-grenze	*10pg/ml*	*10pg/ml*	*20pg/ml*	*5pg/ml*	*1µM*	
237	1384	14000	N		4,5	60%
240	32	24	N	N	N	67%
248a	1088	16000	N	N	N	66%
261	2200	16000	82	101	2,2	50%
263	74	450	N			60%
265	>5000	14000	325	N	N	70%

Diese FCS-freien MCMs (Tab.11) wurden alle mit **Humanem Gammaglobulin** (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA) produziert. Alle untersuchten MCMs induzierten eine Reifung der dendritischen Zellen. In zwei von 6 untersuchten MCMs wurden nur sehr geringe Mengen von TNF und IL-1β produziert. Jedoch die DCs, die mit diesen MCMs stimuliert wurden, zeigten eine CD 83 Expression. In 2 MCMs wurde IL-12 produziert. Das war allerdings derselbe Blutspender in zwei unterschiedlichen Versuchen.

Es stellte sich die Frage, ob während der drei Tage „differentiation culture" nicht vielleicht ein Zytokin produziert wurde, daß die Reifung induziert. Darum wurden auch „verbrauchte", d. h. am Ende der dreitägigen Differnzierungskultur abgenommene MCMs mit ELISA ausgewertet.

Tab.12: Zytokinproduktion im verbrauchten MCM. * = Doppelt verbrauchtes MCM. N = Negativ, d.h. unter der Nachweisgrenze des ELISAs. (Vergleiche Werte mit denen von unverbrauchten MCM in Tab.10)

Versuchs-nummer	TNF pg/ml	IL-1β pg/ml	IL-12 pg/ml	IL-10 pg/ml	Nitrit µM	CD83 Expression
Nachweis-grenze	*10pg/ml*	*10pg/ml*	*20pg/ml*	*5pg/ml*	*1µM*	
236	124	6000	N	N	5,6	86%
236 *	0	5200	N	N	7,4	83%
244	198	2954	N	N	4,5	79%
233	224	6000	N	N	5,1	N
245	180	36				N
248	0	26				N
268	0	<10	N	N	4,5	N

Bei den „verbrauchten" MCMs zeigte sich, daß, wenn es nochmals als Reifungstimulus eingesetzt wurde, das TNF-α aufgebraucht wurde. Deutlich zu sehen ist das bei Versuch 236 wo im unverbrauchten MCM 286 pg/ml (Tab.10) im einmalig verbrauchten MCM 124 pg/ml und im doppelt verbrauchtem MCM 0 pg/ml nachgewiesen wurden (Tab.12). In anderen Experimenten zeigte sich, daß wenn auch das IL-1β im verbrauchten MCM fast vollständig aufgebraucht wurde, keine Reifung mehr induziert werden konnte. Allerdings konnte im Versuch 233 keine Reifung induziert werden, obwohl noch 6000 pg/ml IL-1β vorhanden waren. Hier fehlten allerdings die TNF-α-Werte des unverbrauchten MCMs. Auch wurde im verbrauchten MCM kein IL-10 und IL-12 mehr gemessen. Das Vorhandensein von TNF-α in größeren Mengen (≥ 100 pg/ml = 0,1 ng/ml) in Kombination mit den anderen entstehenden noch unbekannten Faktoren scheint auf jeden Fall die Reifung von DCs zu induzieren. Allerdings ist eine große Menge an TNF-α allein keine hundertprozentige Garantie für funktionierendes MCM (z.B. Versuch 232 in Tab.10).

4.2.2.4. TNF-α als Reifungsstimulus im Vergleich mit Monozyten-konditioniertem Medium

MCM und TNF (20 ng/ml) induzieren morphologisch, phänotypisch und funktionell die Reifung der dendritischen Zellen. In diesem Kapitel wird untersucht, ob MCM und TNF einen unterschiedlichen Wirkungsmechanismus besitzen und ob die Qualität der Reifung sich voneinander unterscheiden.

Untersuchungen im Kultursystem mit fetalem Kälberserum (FCS)

Konzentrationsabhängigkeit der TNF-α -induzierten Reifung

MCM wurde in der Kultur zu 33,3 % eingesetzt. Die optimale Konzentration des TNF wurde mit Hilfe einer Konzentrationsreihe ermittelt (Abb.41).

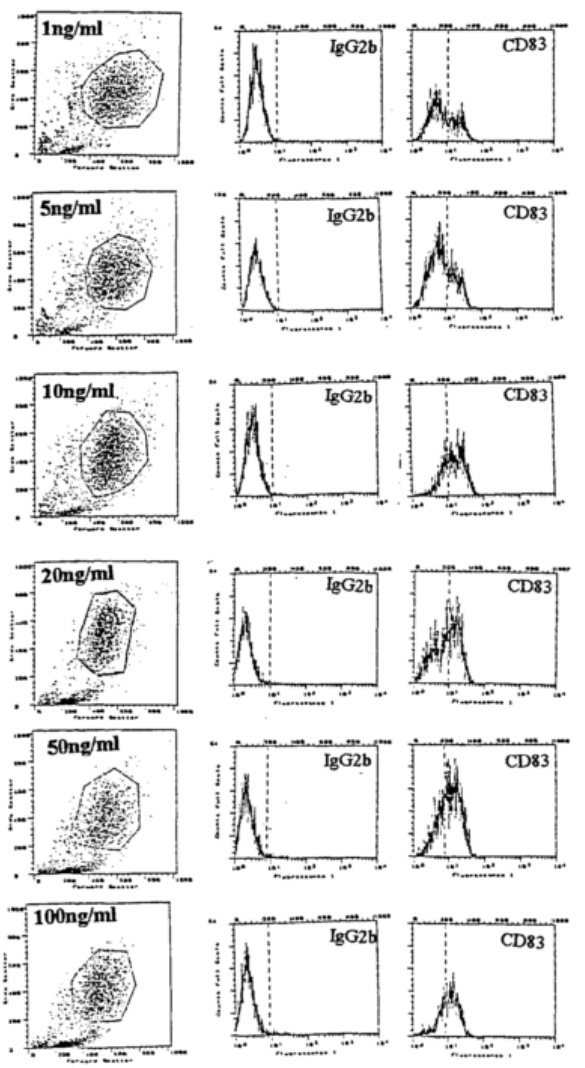


Abb.41: TNF-Konzentrationsreihe. Diese Abbildung ist für 3 Versuche repräsentativ.

Um eine vollständige Reifung zu induzieren, lag die ideale TNF-Konzentration im Bereich von 10 ng/ml bis 20 ng/ml (Abb.41). In allen weiteren Versuchen wurden 20 ng/ml als Reifungsstimulus verwendet.

Mit 50 ng/ml und 100 ng/ml wurde CD83 exprimiert, allerdings nicht besser als bei 10 – 20 ng/ml. Die Morphologie dieser DCs zeigte eine Überstimulierung, d.h. die Zellen waren stark granuliert und wirkten „alt" (apoptotisch).

Morphologischer Vergleich

Morphologisch konnte zwischen dendritischen Zellen die in MCM oder in TNF gereift wurden kein Unterschied festgestellt werden. Die DCs waren groß, polymorph, mit langen Veils und bildeten fast keine Zellaggregate mehr. Oft konnte man allerdings beobachten, daß in Kulturen die mit TNF (20 ng/ml) gereift wurden sich vermehrt adhärente Zellaggregate (sogenannte „bad balls") bildeten (Abb. 42).

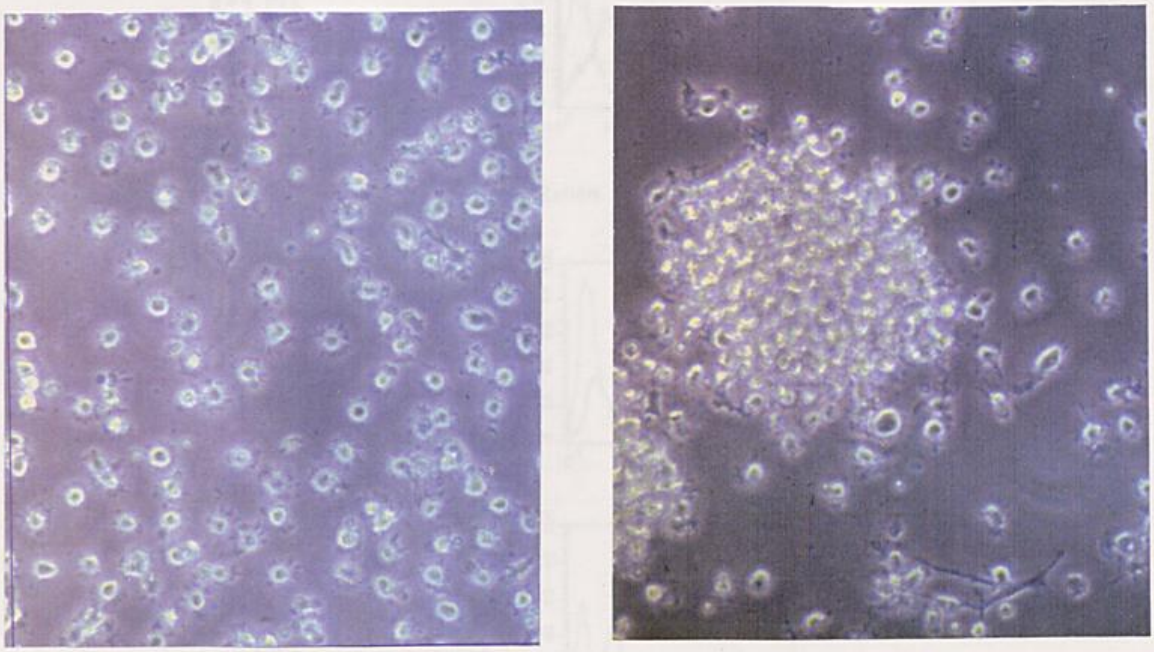


Abb.42: Differentiation culture von in MCM gereiften (links) und in 20 ng/ml TNF (rechts) gereiften dendritischen Zellen am d10.

Phänotypischer Vergleich

Die phänotypischen Unterschiede zwischen dendritischen Zellen die in MCM und TNF-α (20 ng/ml) kultiviert wurden, sind gering. Sowohl DCs, die in MCM, als auch in TNF-α reiften sind $CD1a^+$, $CD83^+$, $CD80^+$, $CD86^+$, $CD14^-$, $CD115^-$, $CD45RO^+$, $CD45RA^-$.

Einzig die Rezeptoren CD87 (Urokinase Plasminogen-Aktivator Rezeptor und CD121a (IL-1 Rezeptor, Typ I) zeigten ein unterschiedliches Expressionsmuster.

In fünf Versuchen wurde bei drei mit Adhärenzmethode gewonnenen DCs, sowohl mit MCM als auch mit TNF-α, CD87 exprimiert. In zwei DC-Kulturen die mit Depletion gewonnen wurden exprimierten die mit MCM stimulierten DCs CD87 nicht oder nur geringfügig. Die auf gleiche Weise gewonnenen, in TNF-α gereiften dendritischen Zellen zeigten eine CD87 positive Subpopulation.

In drei Versuchen, in denen die Expression des IL-1–Rezeptors vom Typ 1, CD121a untersucht wurde, zeigte sich eine unterschiedliche Expression dieser Rezeptormoleküle. Die Zellen, die in der „differentiation culture" in MCM kultiviert wurden, exprimierten kein CD121a. DCs, die in TNF (20 ng/ml) kultiviert wurden, wiesen hingegen eine starke CD121a Expression auf (Abb.43).

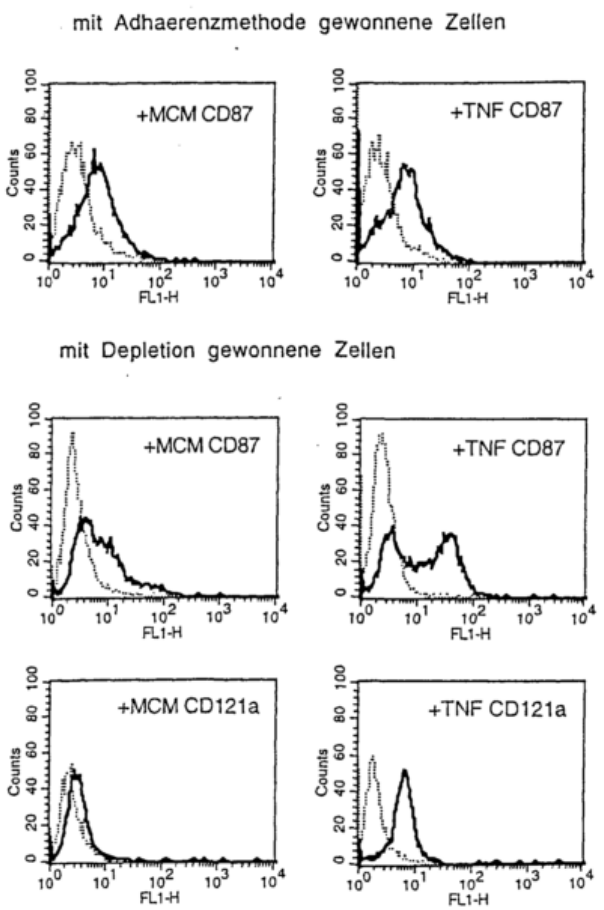


Abb.43: CD87 und CD121a Expression von dendritischen Zellen die in MCM und TNF gereift wurden.

Funktioneller Vergleich

In der MLR konnten keine eindeutigen Unterschiede festgestellt werden (Abb. 44). Von 10 Versuchen stimulierte in 4 Versuchen MCM die T-Zellen besser als TNF. In vier weiteren Versuchen kehrte sich das Bild um: in TNF gezüchtete dendritische Zellen stimulierten die T-Zellen besser als in MCM kultivierte DCs.

In zwei Versuchen konnte kein Unterschied in der Stimulationsfähigkeit von T-Zellen gefunden werden, die entweder in MCM oder in TNF kultiviert wurden (Abb.44).

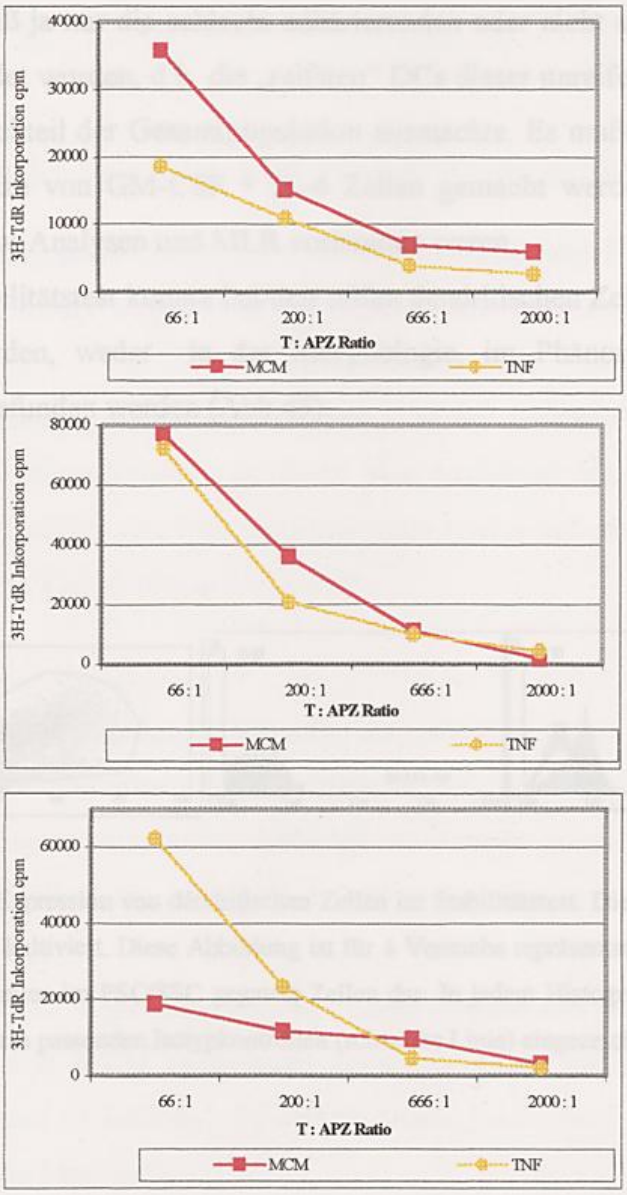


Abb.44: Immunostimulatorische Funktion von dendritischen Zellen die in MCM und TNF gereift wurden.

Vergleich der Stabilität des Reifungszustands

Hier wurde getestet, ob die von d7-d10 gereiften dendritischen Zellen nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS, in H10 (d.h. RPMI Medium + 10% Humanserum), dem idealen Medium für die Differenzierung von Makrophagen, für 48 Stunden (d.h. von d10-d12) ihren Habitus als ausdifferenzierte, reifen dendritischen Zellen behielten.

Unreife dendritische Zellen, die diesen Bedingungen ausgesetzt wurden, verloren ihre Morphologie und wurden zu adhärenten, spindelförmigen Vorläuferzellen. Die stimulatorischen Fähigkeiten sind jedoch erstaunlich gut (Abb.45b). Der Grund dafür dürfte sein, daß ja nur die schlecht adhärierenden oder nicht adhärierenden Zellen für die MLR verwendet wurden, d.h. die „reifsten" DCs dieser unreifen Population, die allerdings nur einen Bruchteil der Gesamtpopulation ausmachte. Es mußten daher auch immer mehr Versuchsansätze von GM-CSF + IL-4 Zellen gemacht werden, damit überhaupt genug Zellen für Flow-Analysen und MLR vorhanden waren.

Im Stabilitätstest konnte bei den reifen dendritischen Zellen, die in MCM oder TNF kultiviert wurden, weder in der Morphologie, im Phänotyp noch in der MLR ein Unterschied gefunden werden (Abb.45).

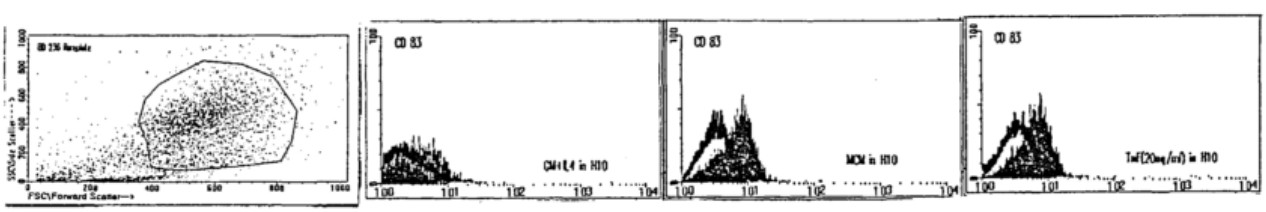


Abb.45a: CD83 Expression von dendritischen Zellen im Stabilitätstest. Die Zellen wurden 48 Stunden ohne Zytokine in H10 kultiviert. Diese Abbildung ist für 4 Versuche repräsentativ. Die Histogramme der FACS-scan Analysen stellen im FSC/SSC gegatete Zellen dar. In jedem Histogramm sind die mAb (volle, graue Peaks) und die dazu passenden Isotypkontrollen (schwarze Linie) eingezeichnet.

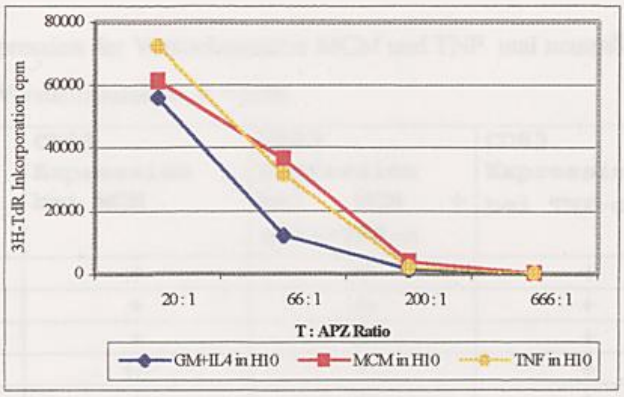


Abb.45b: Immunostimulatorische Funktion von dendritischen Zellen nach 48 Stunden in H10 (Stabilitätstest). Diese Abbildung ist für 2 Versuche repräsentativ.

Bestimmung der Spezifität der TNF-α Wirkung mittels neutralisierender Antikörper

Die grundlegende Frage, ob TNF der entscheidende Reifungsfaktor im MCM ist, wurde mit Hilfe der Zugabe von neutralisierendem Antikörper gegen TNF zu klären versucht.

Die am besten wirksamste Konzentration des neutralisierenden Antikörpers wurde durch eine Konzentrationsreihe bestimmt. Der Antikörper lag als Hybridomzell-Überstand vor. Die Konzentation von 10% Volumsprozent erwies sich als optimal und wurde deshalb in allen weiteren Experimenten verwendet.

Phänotyp

In Tabelle 13 wurden 13 Versuche aufgelistet, in denen MCM und TNF (20 ng/ml) eine Reifung der dendritischen Zellen induzierten.

Durch Zugabe von neutralisierendem Antikörper gegen TNF wurde die Reifung der dendritischen Zellen die mit TNF kultiviert wurden in fast allen Fällen vollständig blockiert.

In 8 von 13 Versuchen kam es durch Zugabe des neutralisierenden Antikörpers gegen TNF zu in MCM kultivierten Zellen zu keiner vollständigen Verhinderung der CD83 Expression (= Reifung). Allerdings wurde bei Versuch 319 auch TNF + anti-TNF nicht vollständig blockiert.

Bei 4 Versuchen konnte die Reifung durch MCM mit der Zugabe von anti-TNF die CD83 Expression vollständig gehemmt werden. Allerdings erfolgte in zwei dieser Experimente (238, 316) durch MCM nur eine teilweise Reifung der dendritischen Zellen. Die CD83 Expression betrug dort nur ca.40 %.

Tab.13: CD83 Expression der Versuchsansätze MCM und TNF und neutralisierender Antikörper gegen TNF (α-TNF). Vsnr = Versuchsnummer, F = fehlt

Versuchs-nummer	CD83 Expression bei MCM	CD83 Expression bei MCM + anti-TNF-α	CD83 Expression bei TNF-α	CD83 Expression bei TNF-α + anti- TNF-α
206	+	+/-	+	-
233	+	-/+	+	F
236	+	F	+	-
238	+/-	-	+	-
242	+	-/+	+	-
243	+	-/+	+	-
301	+	-/+	+	F
302	+	-	+	-
311	+	-	+	-
316	+/-	-	+	-
319	+	-/+	+	-/+
322	+	-/+	+	-
327	+	-/+	+	-

Aus Tab.13 sieht man, daß der neutralisierende Antikörper gegen TNF-α die Reifung durch MCM nicht vollständig blockieren konnte und die Reifung durch TNF (20 ng/ml) durch neutralisierenden Antikörper gegen TNF komplett aufgehoben werden konnte.

MLR

Um auszuscheiden, daß der neutralisierende Antikörper unspezifisch hemmt (z. B. toxisch ist oder durch Verdünnung des Kulturmediums hemmt), wurde die passende Isotypkontrolle des neutralisierende Antikörper anstelle des neutralisierenden Antikörpers zu in MCM reifenden Zellen zugegeben.

Aus Abb.46 ersieht man, daß MCM + Isotyp des neutralisierenden Antikörpers keine veränderte T-Zell-Stimulationsfähigkeit induziert.

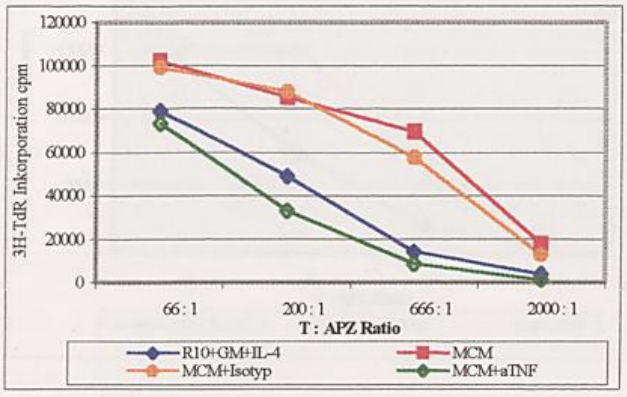


Abb.46: Immunostimulatorische Funktion von dendritischen Zellen die mit R10+GM-CSF+ IL-4, MCM, MCM+Isotypkontrolle von neutralisierendem Antikörper gegen TNF (aTNF) und MCM+ aTNF (neutralisierender Antikörper gegen TNF) stimuliert wurden.

In sieben von zehn Versuchen stimulierten die in MCM + anti-TNF kultivierten DC besser, als dendritische Zellen die in TNF + anti-TNF kultiviert wurden (Abb.47).

In zwei Versuchen kehrte sich das Bild um, allerdings konnte bei einem der zwei Versuche weder mit MCM + anti-TNF noch mit TNF + anti-TNF die Reifung vollständig blockiert werden (319). Bei einem Versuch lagen die Kurven so eng zusammen, daß kein signifikanter Unterschied bestimmt werden konnte.

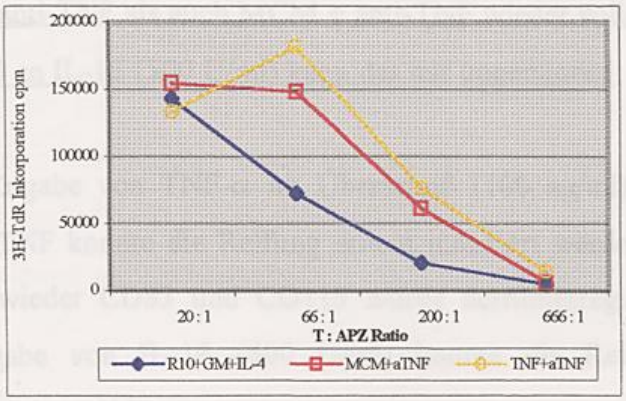


Abb.47: Immunostimulatorische Fähigkeiten von dendritischen Zellen die mit MCM + anti-TNF und TNF + anti-TNF stimuliert wurden.

Betrachtet man nun die Gesamtheit der MLRs dieser 10 Versuche, d.h. die Versuchsansätze R10+GM-CSF+IL-4, MCM, TNF (20 ng/ml), MCM + α-TNF und TNF + α-TNF und staffelt die Versuchsansätze nach ihrer Stimulationsfähigkeit (Tab.14) sieht man, daß MCM und TNF (je 4 x **1**) erwartungsgemäß an der Spitze stehen, gefolgt von MCM + α-TNF, R10+GM-CSF und zuletzt TNF + α-TNF (5 x **5**). Selbst wenn die Reifung der dendritischen Zellen mit MCM durch anti-TNF blockiert wurde, stimulieren diese Zellen besser als unreife DCs in R10 + GM-CSF + IL-4. Auf jeden Fall sind sie bedeutend besser als TNF + anti-TNF.

Tab.14: Tabelle von 10 unabhängigen Versuchen mit den Stimulationsansätzen R10+GM-CSF, MCM+GM-CSF+IL-4, TNF (20 ng/ml) + GM-CSF+ IL-4, MCM + α-TNF+GM-CSF+IL-4 und TNF + α-TNF+GM-CSF+IL-4. 1 = beste Stimulationsfähigkeit, 2 = zweitbeste Stimulationsfähigkeit, 3 = drittbeste Stimulationsfähigkeit, usw....

Vsnr.	R10+GM-CSF+IL-4	MCM	TNF	MCM + α-TNF	TNF + α-TNF
238	**2**	**1**	**4**	**3**	**5**
242	**4**	**2**	**1**	**3**	**5**
243	**4**	**2**	**1**	**3**	**5**
300	**5**	**2**	**1**	**4**	**3**
302	**2**	**1**	**5**	**4**	**3**
311	**4**	**1**	**3**	**2**	**5**
316	**3**	**2**	**1**	**5**	**4**
319	**3**	**5**	**4**	**1**	**2**
322	**5**	**3**	**4**	**1**	**2**
327	**4**	**1**	**3**	**2**	**5**

Durch einen Überschuß an TNF-α (100 ng/ml) kann die Reifungsblockade sowohl von TNF-α + anti-TNF als auch MCM + anti-TNF wieder vollständig aufgehoben werden. Ein Überschuß an IL-1β (500 U/ml) kann das nur ungenügend.

Durch Zugabe von TNF-α im Überschuß (100 ng/ml) zu TNF + anti-TNF oder MCM + anti-TNF konnte die Reifung erneut induziert werden. Die dendritischen Zellen exprimierten wieder CD83 und CD115 wurde herrunterreguliert (Abb.48). Durch eine Überschußzugabe von IL-1β (500 U/ml) konnte die Reifungsblockade nur partiell aufgehoben werden (Abb.48).

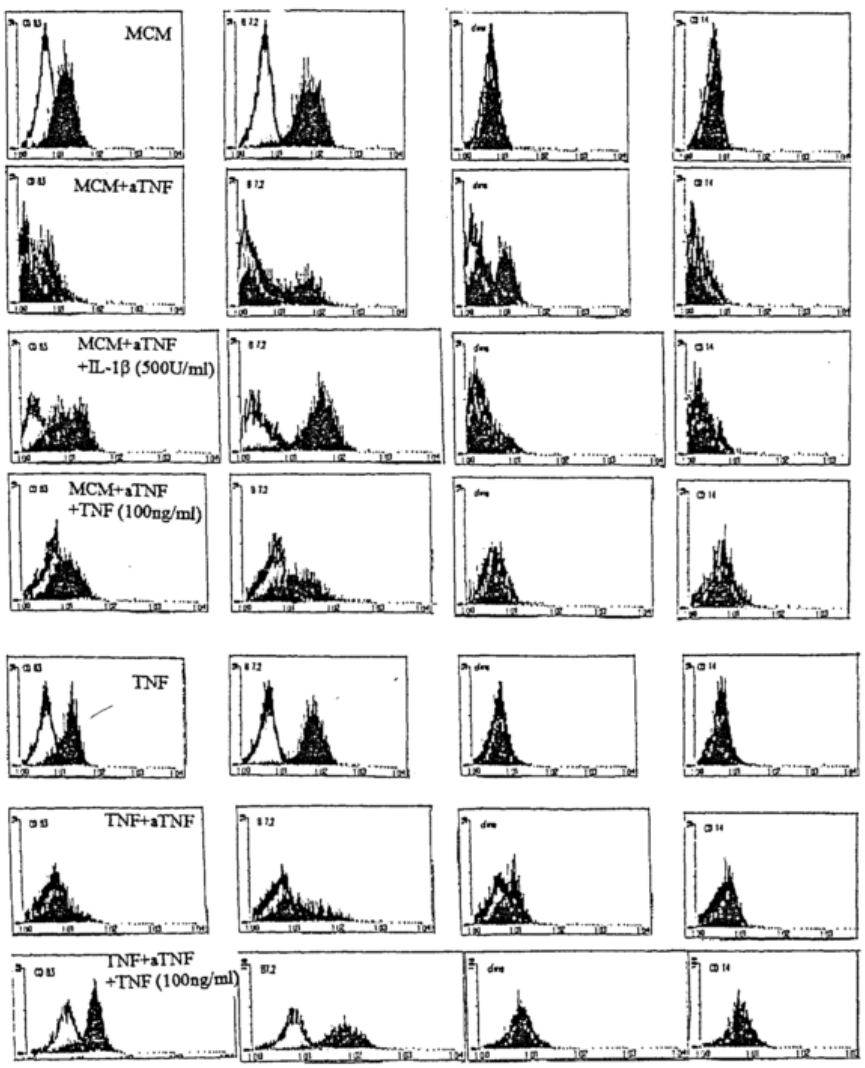


Abb.48: CD83, CD86 (B7-2), CD115 (cfms) und CD14 Expression von dendritischen Zellen. Versuch der Aufhebung der Reifungsblockade durch Überschuß an TNF-α (100 ng/ml) und IL-1β (500 U/ml). Die Versuche mit IL-1β (500 U/ml) wurden mit zwei Versuchen getestet und mit TNF-α (100 ng/ml) mit fünf Versuchen.

Die MLR bestätigte die Ergebnisse. Allerdings wurde das Experiment nur einmal gemacht und nicht durch Wiederholung überprüft. In der MLR schien der Überfluß an IL-1β in der Kultur die Stimulationsfähigkeit der dendritischen Zellen gleich gut wie in MCM kultivierte dendritische Zellen zu induzieren. Phänotypisch und morphologisch konnte der Überschuß von IL-1β den fehlenden (durch Antikörperneutralisation) TNF-α im MCM zumindest teilweise ersetzen. Funktionell ersetzte IL-1β den TNF-α vollständig (Abb.49).

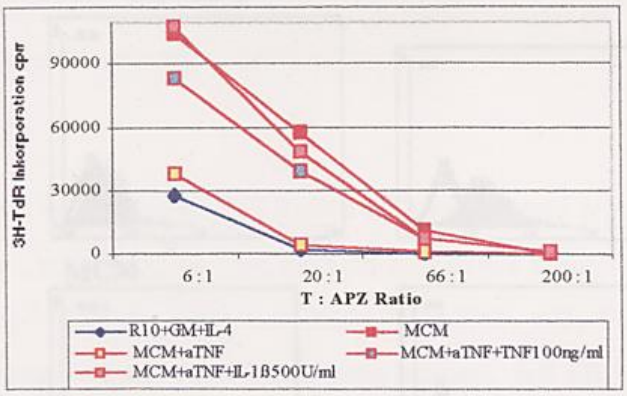


Abb.49: Immunostimulatorische Fähigkeit der dendritischen Zellen im Vergleich. Diese Abbildung stellt ein Einzelexperiment dar.

Wirkt TNF-α direkt oder durch Induktion anderer Zytokinen

Um diese Frage zu beantworten, wurde verbrauchtes MCM am d10 gesammelt und zur erneuten Stimulation eines Versuchs verwendet. Aus dem Experiment 238 ersah man (Abb.50), daß dieses verbrauchte MCM wesentlich besser stimulierte als „frisches" MCM. Die Idee war nun: wenn sich dieses verbrauchte MCM mit anti-TNF schlechter blockieren läßt als frisches MCM + anti-TNF, so wurde während der Reifung Zytokine produziert die die Reifung verbessern bzw. induzieren. Versuch 238 ließ diesen Schluß vermuten.

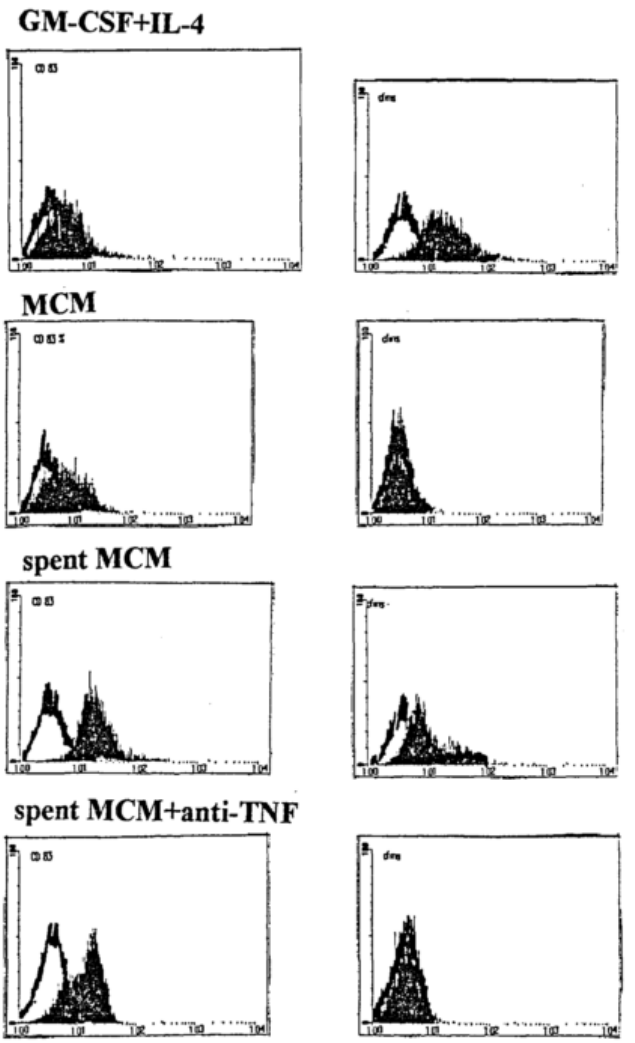


Abb.50a: CD83 und CD115 Expression von dendritischen Zellen im Versuch 238. Die Histogramme der FACS-scan Analysen stellen im FSC/SSC gegatete Zellen dar. In jedem Histogramm sind die mAb (volle, graue Peaks) und die dazu passenden Isotypkontrollen (schwarze Linie) eingezeichnet.

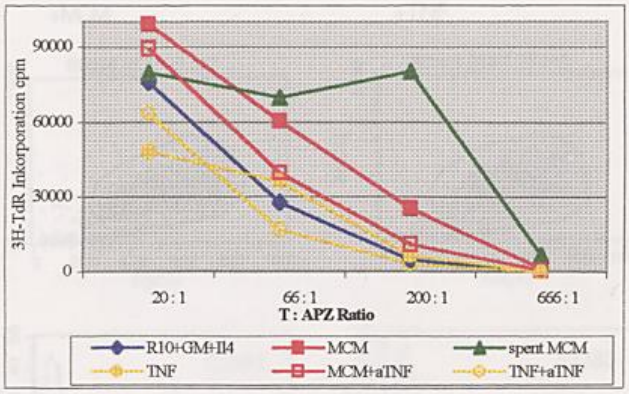


Abb.50b: Immunostimulatorische Funktion von dendritischen Zellen aus Versuch 238. Die Zellen wurden mit der Adhärenzmethode gewonnen . (spent MCM = verbrauchtes MCM)

Die Daten von Versuch 238 ließen sich nur einmal reproduzieren. In fünf weiteren Versuchen mit „verbrauchtem MCM" ließ sich damit keine Reifung induzieren. Auch die MLR der spent MCM lag zwischen R10 + GM-CSF + IL-4 und MCM. Auch stellte sich mit Durchführung von mehreren Versuchen herraus, daß MCM gereifte Zellen durch anti-TNF nicht vollständig blockiert werden konnten. Somit fiel eine Prämisse der Überlegung des Versuchsansatzes weg und diese Experimente waren nicht zur Beantwortung der gestellten Fage verwertbar.

Untersuchung im Kultursystem ohne fetalem Kälberserum

Phänotypischer Vergleich

Im FCS-freien System konnten die Ergebnisse aus dem FCS-haltigem System bestätigt werden. Die Morphologie der in MCM oder TNF kultivierten Zellen unterschied sich nicht.

Phänotypisch wurden 9 Versuche ausgewertet. CD121a und CD 87 wurden nicht untersucht und die anderen untersuchten Antikörper zeigten keine unterschiedliche Expression (Abb.51).

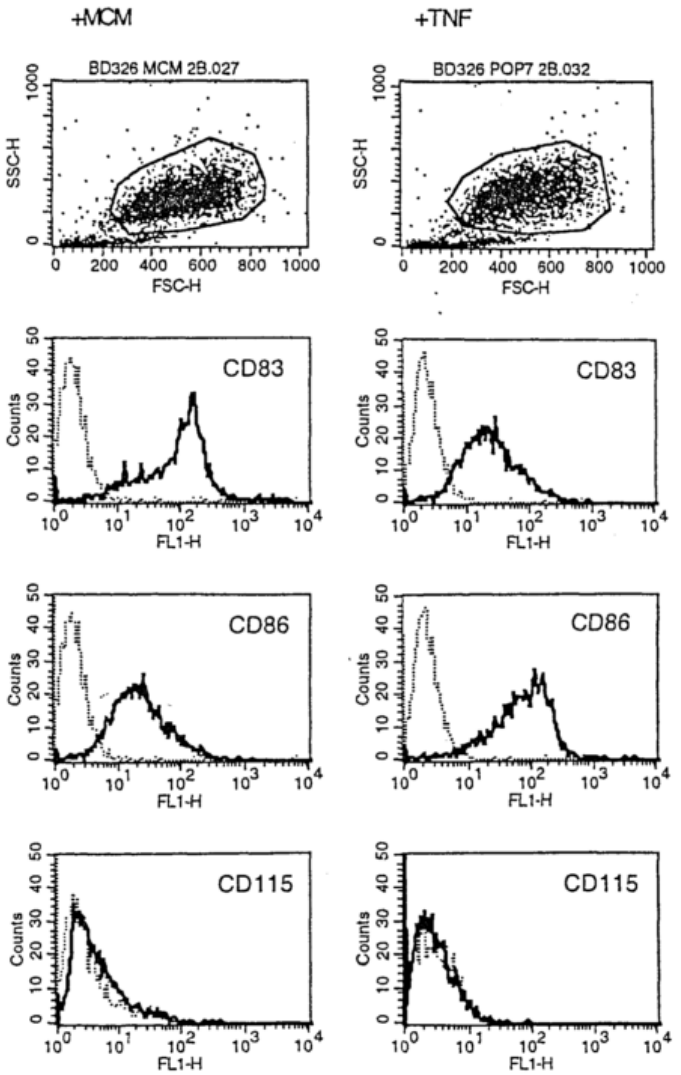
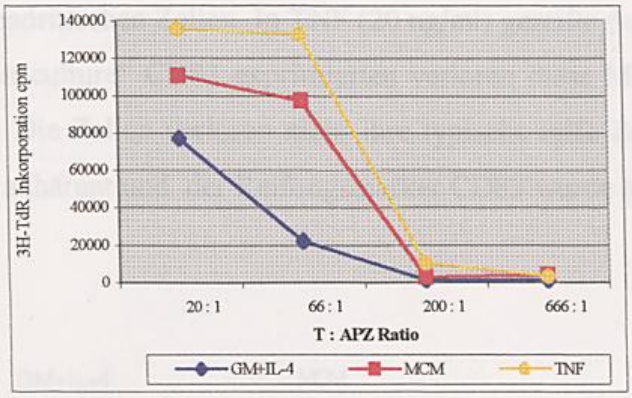
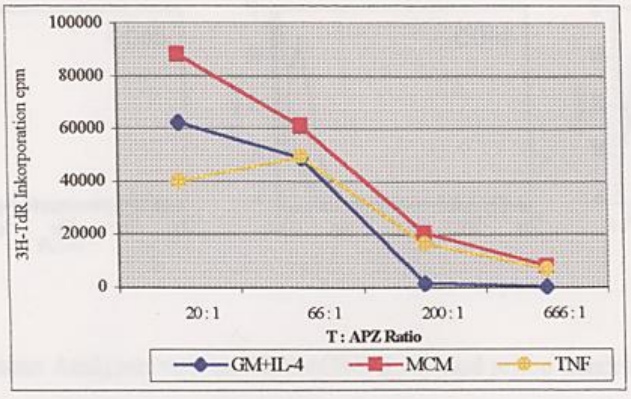


Abb.51: : FACS-scan Analysen von reifen dendritischen Zellen die im FCS-freien System mit MCM (links) und TNF (rechts) stimuliert wurden. Die Abbildung ist für 9 Versuche repräsentativ. Die Histogramme der FACS-scan Analysen stellen im FSC/SSC gegatete Zellen dar. In jedem Histogramm sind die mAb (fette Linie) und die dazu passenden Isotypkontrollen (gepunktete Linie) eingezeichnet.

Funktioneller Vergleich

Die immunostimulatorische Fähigkeit wurde bei 4 Versuchen bestimmt und wiederum bestätigte sich das Bild aus dem FCS-haltigen System; bei zwei Versuchen stimulierte MCM besser als TNF, bei einem Versuch kehrte sich das Bild um. Bei einem Versuch waren die Kurven so ähnlich, daß kein Unterschied bestimmt werden konnte (Abb. 52).





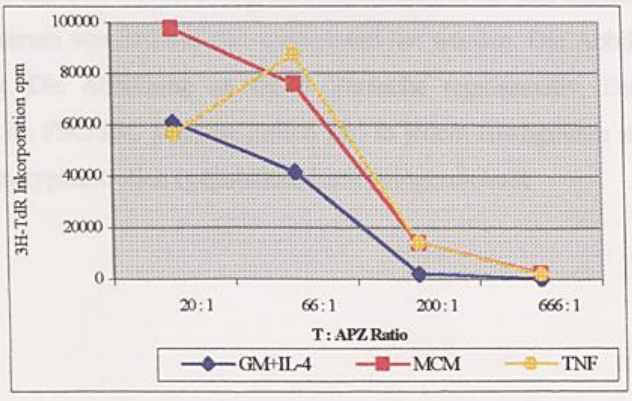


Abb.52: Immunostimulatorische Funktion von dendritischen Zellen die in R10+GM-CSF+IL-4, MCM und TNF gereift wurden. Die Abbildung zeigt 4 unterschiedliche Versuche.

Vergleich der Stabilität des Reifungszustands

Einzig im Stabilitätstest zeigte sich ein Unterschied zwischen in MCM und TNF kultivierten dendritischen Zellen. In TNF (20 ng/ml) gereifte dendritische Zellen, die in der „differentiation culture" CD83 exprimierten verloren diese Molekül nach 48 Stunden im Stabilitätstest. Die Zellen verloren nicht ihre typische reife Zellmorphologie und wurden nur teilweise adhärent und der Reifungsmarker CD83 wurde herunterreguliert (Abb.53).

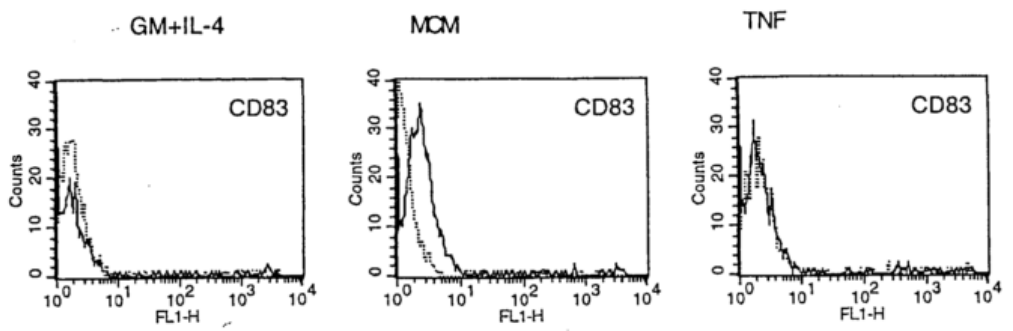


Abb.53: FACS-scan Analysen von unreifen (GM+IL-4) und reifen dendritischen Zellen, die im FCS-freien System mit MCM und TNF-α von d7 auf d10 stimuliert wurden und anschließend im zytokinfreien Medium mit 10% Humanserum von d10 auf d12 weiterkultiviert wurden. Die Abbildung zeigt die CD83 Expression im Stabilitätstest. Die Abbildung ist für 3 Versuche repräsentativ. Die Histogramme der FACS-scan Analysen stellen im FSC/SSC gegatete Zellen dar. In jedem Histogramm sind die mAb (fette Linie) und die dazu passenden Isotypkontrollen (gepunktete Linie) eingezeichnet.

Bestimmung der Spezifität der TNF-α Wirkung mittels neutralisierender Antikörper

In drei Versuchen bestätigen sich die Ergebnisse aus dem FCS-haltigen System. Bei zwei Versuchen wurde MCM + anti-TNF nur teilweise blockiert und im dritten Versuch vollständig. Die Reifung der DCs in TNF + anti-TNF wurde immer vollständig blockiert (Abb.54). Diese Ergebnisse wurden auch mit der MLR bestätigt.

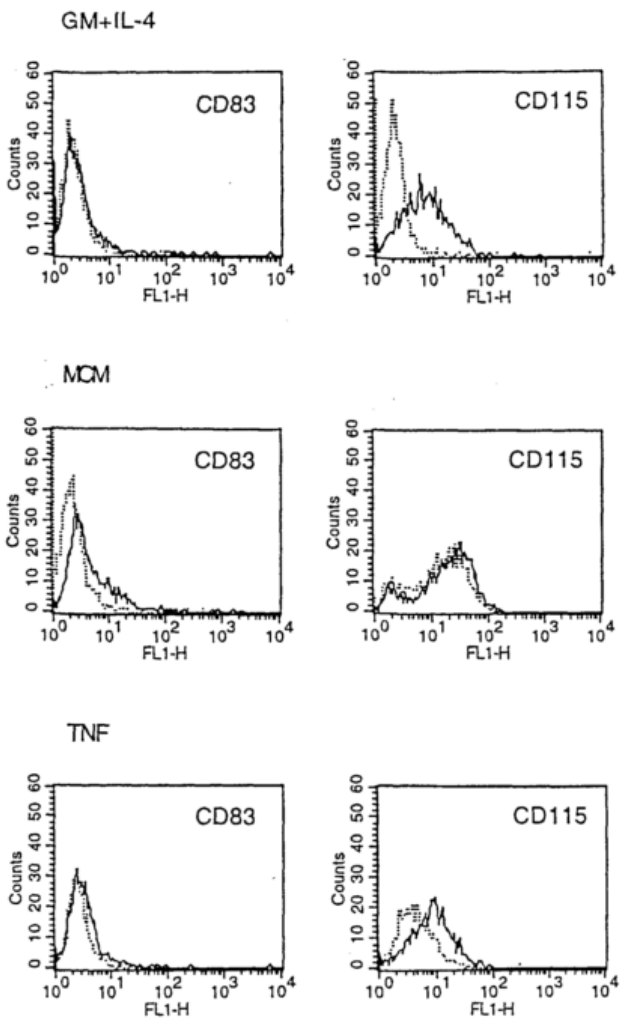


Abb.54a: FACS-scan Analysen von unreifen (GM+IL-4) und geblockten dendritischen Zellen, die im FCS-freien System mit MCM + anti-TNF und TNF + anti-TNF stimuliert wurden. Die Abbildung ist für 3 Versuche repräsentativ. Die Histogramme der FACS-scan Analysen stellen im FSC/SSC gegatete Zellen dar. In jedem Histogramm sind die mAb (fette Linie) und die dazu passenden Isotypkontrollen (gepunktete Linie) eingezeichnet.

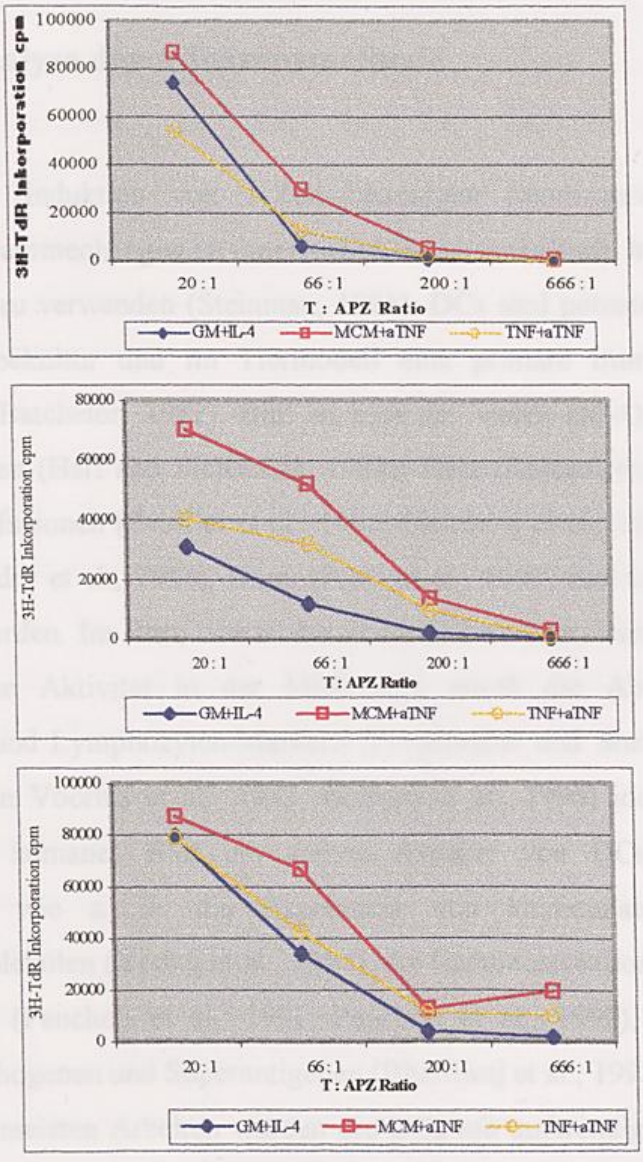


Abb.55b: Immunostimulatorischen Funktion von dendritischen Zellen im FCS-freien System. Diese Abbildung stellt drei unabhängige Experimente dar.

5. Diskussion

5.1. Analyse der Adhärenzmethode

Um die Induktion von T-Zell-abhängigen Immunantworten in verschiedenen klinischen Zusammenhängen zu untersuchen, ist es vorteilhaft, humane dendritische Zellen aus dem Blut zu verwenden (Steinman, 1991). DCs sind potente APCs und sie sind fähig in der Gewebekultur und im Tiermodell eine primäre Immunantwort zu induzieren (Lechler and Batchelor, 1982). Blut ist eine der vielen DC-Quellen, die im Menschen, neben Tonsillen (Hart and McKenzie, 1988), Haut (Romani et al., 1989a), rheumatoiden synovialen Effusionen (Zvaifler et al., 1985; Bhardwaj et al., 1988; Bhardwaj et al.,1989), Thymus (Landry et al., 1988), Darm (Pavli et al., 1993) und Lunge (Nicod, et al., 1990) verwendet wurden. Im Blut, wie in den anderen Geweben, werden DCs durch ihre starke stimulatorische Aktivität in der MLR und durch die Abwesenheit von typischen Monozyten- und Lymphozyten-Markern (Freudenthal und Steinman, 1990; Bhardwaj, et al., 1989; Van Voorhis et al., 1983, Romani et al., 1996) identifiziert. Spätere Studien verwendeten humanes Blut um andere Aspekte von DCs und ihrer Funktion zu untersuchen, wie z. B. die Expression von kostimulatorischen Molekülen und Adhäsionsmolekülen (Young et al., 1992), die Immunoselektion von Antigen-reaktiven T-Zellenklonen (Pancholi et al., 1991; Pancholi et al., 1992), und die Präsentation von humanen Pathogenen und Superantigenen (Bhardwaj et al., 1992).

In den meisten Arbeiten wurden die DCs mit aufwendigen und teuren Prozeduren wie Elutriation, MACS (Magnetic-absorbent-cell-sorter), magnetische Beads und Rosettieren mit Schaferythrozyten gewonnen.

Die hier etablierte Adhärenzmethode stellt eine einfache, kostengünstige und vor allem klinisch verwendbare Methode dar, um reife dendritische Zellen und ihren Reifungsstimulus vom selben Spender in rentabler Menge zu erlangen.

5.1.1. Ausbeute und Anreicherung

Die Anreicherung von dendritischen Zellen, die mit der Adhärenzmethode gewonnen wurden, ist im Vergleich zu DCs, die mit magnetischen Beads oder mit Neuraminidase-behandelten Schaferythrozyten gewonnenen wurden, am größten. Mit der Adhärenzmethode konnte im autologen System eine Anreicherung von 85% ± 7,5 erzielt werden, mit den magnetischen Beads 75% ± 10,6 und mit Rosettieren mit Schaferythrozyten 60% ± 9,1.

Bei der Adhärenzmethode binden die Monozyten/Makrophagen in den PBMC-Populationen über ihren Fc-Rezeptor am Immunglobulin. Wie in Abb.9 gezeigt wurde, adhärierten auch die B-Zellen nach einer Stunde. Sie lösten sich aber nach den ersten 24 Stunden und wurden dann vor der Zytokinzugabe weggewaschen. Die Ausbeute an reifen und unreifen DCs, die mit der Adhärenzmethode gewonnen wurden ist im FCS-freien System geringfügig besser als mit den magnetischen Beads oder mit den Schaferythrozyten. Im wesentlich unsensibleren FCS-haltigen System erreichte man mit den magnetischen Beads die beste Ausbeute. Die unterschiedliche Ausbeute zu erklären ist schwierig, weil die Depletionsprozedur bis zur Kultivierung in den 6-well-Platten, wo dann FCS-haltiges Medium verwendet wird, gleich ist.

In den DC-Kulturen, die durch Depletion mit Neuraminidase-behandelten Schaferythrozyten, die am CD2-Rezeptor von T-Zellen und NK-Zellen binden, gewonnen wurden, konnte ein Großteil der B-Zellen nicht entfernt werden. Diese Art der DC-Gewinnung eignet sich nicht für klinischen Anwendung (1) aufgrund der Verwendung von Schaferythrozyten und (2) der kontamienierenden Population von B-Zellen in der Kultur. Allerdings ist diese Art der DC-Gewinnung von Vorteil für Experimente, wo syngene T-Zellen gebraucht werden.

Bei den mit magnetischen Beads gewonnen Kulturen wurden sowohl T-Zellen und NK-Zellen mit CD2 Antikörper und die B-Zellen mit CD19 Antikörper entfernt. Aber um wirklich alle B-, T- und NK-Zellen mit magnetischen Beads zu depletieren, müßte man die Zugabe der Beads 3x wiederholen. Dabei werden allerdings auch jedesmal Monozyten/Makrophagen, die sich an die T-Zellen oder unspezifisch binden, depletiert und die Ausbeute an $CD14^+$ Zellen wird zu gering. So erschien der Kompromiß der zweimaligen Depletion mit geringerer Reinheit aber größerer Ausbeute akzeptabel.

5.1.2. Das Reifungs-Phänomen

DCs die mit der Adhärenzmethode gewonnen wurden und sozusagen im „eigenen" MCM reiften, zeigten eine ausgeprägte und typische dendritische Zellmorphologie. In 38% der Experimente entsprachen die unreifen, mit Adhärenzmethode gewonnenen DCs nicht dem „klassischen" Bild von unreifen DCs (Abb.12 und Abb.20). Das konnte man auch an der erhöhten CD83 Expression sehen. Dieses Phänomen erklärt sich wohl dadurch, daß sich die Monozyten/Makrophagen, die sich nach Zugabe von GM-CSF + IL-4 nicht gleich von der Petri-Schale lösen die gleichen Zytokine produzierten wie im MCM. Dieses verdünnte MCM reichte, um die dendritischen Zellen teilweise zu reifen. Wieviele Monozyten/Makrophagen sich in DCs „transformieren" ließen, hing davon ab, wieviele Monozyten mit einem „Bipotential" sich je nach exogenem Zytokinstimulus entweder in Makrophagen oder dendritische Zellen umformten. O´Doherty et al. (1994) gewann DCs aus humanem Blut und kultivierte diese 1 – 2 Tage in MCM und induziert damit die Reifung. Diese DCs hatten ihre „priming phase" allerdings schon hinter sich, da es sich hier wahrscheinlich um DCs aus Gewebe auf den Weg zu Lymphknoten oder zur Milz oder –wahrscheinlicher- auf den Weg vom Knochenmark in die Gewebe, handelte. Die in dieser Arbeit gewonnenen $CD14^+$ Zellen müssen erst zu DCs „transformiert" bzw. „geprimed" werden, um mit Hilfe des MCMs zu reifen. Die direkte Zugabe von MCM auf die mit γ-Globulin beschichteten Platten, an denen $CD14^+$ Zellen adhärieren, führt nur zur Ablösung von einem Bruchteil der Zellen, die stark granuliert waren und keine veils ausbildeten.

Alle dendritischen Zellen, die mit MCM reiften, zeigten eine höhere Fähigkeit, ruhende T-Zellen zu stimulieren als DCs, die in GM-CSF + IL-4 kultiviert wurden. Das wurde sogar beobachtet, wenn das MCM keine morphologische und phänotypische Reifung induzierte. Die Zytokine aus dem „verdünnten" MCM und die wenigen Zytokine in einem „nicht-funktionierendem" MCM bewirken eine erhöhte Expression der kostimulatorischen Moleküle und damit bessere stimulatorische Fähigkeiten der APCs. Die verbesserte, aber nicht maximale Stimulationsfähigkeit der DCs ist also nicht unmittelbar an die Expression des Reifungsmarkers CD83 gebunden.

5.2.1. MCM im autologen System

Eine wichtige Modifikation der MCM-Produktion bedeutete die Verwendung von spendereigenem Immunglobulin (in Form von Serum oder Plasma) zur Beschichtung der MCM-Platten. Es zeigte sich, daß klinisch verwendetes Immunglobulin nicht immer fähig war, die adhärenten Monozyten ausreichend zu stimulieren. So wurden nicht genug Zytokine ins MCM ausgeschüttet und die Reifung der DCs konnte nicht induziert werden. In 70% der Fälle induzierte diese käufliche, klinisch verwendbare Immunglobulin eine komplette Reifung in 15% eine teilweise und in 15% keine Reifung. Durch das spendereigenen Immunglobulin wurde diese Instabilität des MCM, die durch unterschiedliche γ-Globulinchargen entstand, ausgeschalten.

Als Kompromiß wurde im FCS-haltigen System das Humane Gammaglobulin von Sigma verwendet, bei dem es sich um eine Cohn Fraktion II, III handelt, d.h. dieses Gammaglobulin ist nicht hochgereinigt und enthält eventuell noch andere Globuline und Albumine. So ähnelt es dem Gammaglobulin aus dem Serum des Spenders, und es hatte die gleiche „100%-ige" Wirkung. Eventuell bewirkten genau diese „Zusatzstoffe" die nötige Aktivierung der Monozyten und ließen sie inflammatorische Zytokine, Chemokine und noch andere unbekannte Faktoren produzieren. Möglich wäre natürlich auch, daß durch die Reinigungsverfahren, denen Gammaglobulin unterliegt, um es klinisch verwendbar zu machen, der Fc-Rezeptor beschädigt wird und so keine vollständige Aktivierung der Monozyten zustande kommt.

5.2. Entwicklung und Reifung der dendritischen Zellen

5.2.1. Einfluß der Kulturbedingungen während der frühen Kulturphase („priming culture")

5.2.1.1. Ist IL-4 durch IL-13 austauschbar?

Der erste Nachweis, daß dendritische Zellen aus PBMCs aus dem peripheren Blut mit GM-CSF + IL-13 kultiviert werden können, stammte von Piemonti et al. (1995). Piemonti et al. fanden keine Unterschiede zwischen den dendritischen Zellen die in GM-CSF + IL-4 und GM-CSF + IL-13 kultiviert wurden. In dieser Arbeit zeigten dendritische Zellen, die in GM-CSF + IL-13 kultiviert wurden Oberflächenmarker und Antigen-Präsentationsfähigkeiten wie die schon beschriebenen DC in GM-CSF und IL-4. Verglichen mit dendritische Zellen die in GM-CSF + IL-4 kultiviert wurden, exprimierten die in GM-CSF + IL-13 kultivierten weniger MHC II. Auch unterschieden sie sich in der Expression des M-CSF Rezeptors (CD115). In mit GM-CSF + IL-13 gezüchteten dendritischen Zellen wurde CD 115 nicht exprimiert.

CD115 wird von Makrophagen/Monozyten, von Endothelzellen und Fibroblasten gebildet. Das Polypeptid ist etwa 40 kD-groß und bildet ein stabiles Dimer. Der M-CSF-Rezeptor ist strukturell mit dem c-kit verwandt. Es enthält fünf extrazelluläre Ig-Domänen und eine intrazelluläre Tyrosin-Kinase. Das Gen für den M-CSF-Rezeptor wurde ursprünglich als ein normales, zelluläres Gegenstück des viralen Onkogens v-fms identifiziert.

Die in GM-CSF + IL-4 kultivierten unreifen dendritischen Zellen entsprechen den *in vivo* vorkommenden DCs die vom Knochenmark via Blutbahn auf den Weg zu ihrem Bestimmungsort in Haut, Lunge, Respirationstrakt usw. sind.

Aufgrund der verringerten Expression von MHC II auf unreifen dendritischen Zellen, die in GM-CSF + IL-13 kuliviert worden sind, könnte man annehmen, daß IL-13 einen hemmenden Einfluß auf die MHC II Expression hat, oder umgekehrt, daß IL-4 die MHC II Expression im Zusammenspiel mit GM-CSF fördert.

IL-13 ist ein von T-Zellen produziertes Zytokin und teilt viele seiner biologischen Aktivitäten mit dem Th_2 Zytokin IL-4. Ein wichtiger Unterschied ist, daß der IL-13 Rezeptor nicht von der gemeinsamen gamma-Kette gebildet wird, die sich im IL-4 Rezeptorkomplex und in den Rezeptorkomplexen von anderen Zytokinen befindet. Durch

diese gamma-Kette wird eine Jak-3 kinase aktiviert (Sugamura et al. 1995) und eine spezifische Abfolge von Signalen transduziert .

IL-4 ist ein etwa 20 kD großes Monomer, das von Th_2 Zellen und von Mastzellen produziert wird. Es stimuliert die Proliferation von B-Zellen in Gegenwart von anti-Ig-Antikörpern sowie die Generation von B-Zell-Blasten und induziert eine vermehrte Expression von Klasse II MHC-Molekülen (Abbas et al., 1996).

Der IL-4 Rezeptor ist multimerisch und bildet mit IL-4 R-alpha einen Zytokinrezeptor den es mit anderen Zytokinen teilt. Zwei Typen von IL-4 Rezeptoren wurden definiert: einer der von IL-4 R-alpha und der gemeinsamen gamma-Kette gebildet wird und ein zweiter der von IL-4 R-alpha und IL-13 R-alpha gebildet wird und fähig ist, sowohl IL-4 und IL-13 Signale zu transduzieren. Wichtige Effekte von IL-4 tranduzierenden Signalen werden durch JAK/IRS-2 und STAT6 Wege vermittelt (Chromarat and Banchereau, 1997) über die gamma Untereinheit des Rezeptors und unterscheiden sich so vom IL-13 Signalweg.

In Kombination mit GM-CSF ist IL-4 mit IL-13 nicht austauschbar, um Monozyten zu identen DCs zu differenzieren bzw. transformieren. Der aktivierte „common gamma chain –transduction pathway" führen zwar nicht zu veränderter Morphologie und Funktion der unreifen dendritischen Zellen, sehr wohl aber zu unterschiedlichem Phänotyp der DCs.

5.2.1.2. Zusatz von unterschiedlichen Zytokinen in der „priming culture" induzieren keine Reifung

Zugabe von SCF (c-kit) und TNF-α am Tag 0

Durch anfängliche Zugabe von zusätzlichen Stimuli zu GM-CSF + IL-4 wurde versucht eine Reifung zu induzieren. Die verantwortlichen Faktoren, die die komplette Reifung der dendritischen Zellen induzierten sind bis dato nicht bekannt und genauso wenig die genaue Zusammensetzung der Zytokine, die eine Reifung induzieren.

SCF ist ein Monomer und wird von den Stromazellen des Knochenmarks in zwei Formen gebildet: als ein transmembranäres Protein von 27 kD und als sezernierte Form von ungefähr 24 kD. Die verschiedenen Produkte kommen aufgrund eines alternativen Splicing des gleichen Gens zustande.

SCF (*c-kit* ligand) vervielfachte die Ausbeute von dendritischen Zellen, die aus humanem Knochenmark *in vitro* gewonnen wurde (Saraya und Reid, 1996; Young et al. 1995; Szabolcs et al. 1995). Allerdings konnte dieser Effekt nur in synergistischer

Kombination mit GM-CSF und TNF-α beobachtet werden. Strobl et al. (1996) benutzten SCF, GM-CSF, TNF-α und TGFβ$_1$ um CD1a$^+$ Nachkommen von CD34$^+$ Zellen aus dem Blut der Nabelschnur zu gewinnen und zeigten, daß TGFβ$_1$ in diesem System Serum ersetzen kann. Mackensen et al. (1995) züchteten DCs aus CD34$^+$ Zellen aus dem Blut indem sie einen Cocktail aus GM-CSF + IL-4, SCF, IL-1β, IL-3 und IL-6 verwendeten. Damit kultivierten sie einen großen Anteil an CD1a$^+$ Zellen.

In dieser Arbeit wurde versucht, durch Zugabe von SCF oder TNF-α am Beginn der Kultur (1) die Aktivierung der Zellen zu stimulieren und (2) die sich zu dendritischen Zellen differenzierenden CD14$^+$ Zellen zur Reifung zu bringen. Durch die Zugabe von SCF am ersten Tag der Kultur adhärierten die Zellen vermehrt und bildeten Zellagreggate, auch bildeten sich spindelförmige adhärente Vorläuferzellen. Die schwimmenden runden Zellen zeigten keine Veils und nur wenige dieser Zellen (< 5%) zeigten dendritischen Zellmorphologie.

SCF scheint auf die CD14$^+$ Zellen so zu wirken, daß sie wieder zu Vorläufern revertieren und es ist kein Zytokin, daß eine Differenzierung in die spezifische Richtung „dendritische Zelle" induziert. Die immunostimulatorischen Fähigkeiten der schwimmenden mit SCF behandelten Zellen zeigte verminderte Stimulationsfähigkeit im Vergleich mit in GM-CSF + IL-4 behandelten Zellen.

Aus der Literatur ist bekannt, daß die Zugabe von TNF-α die Reifung von in FCS-haltigem Medium gezüchteten dendritischen Zellen aus dem peripheren Blut stimuliert (Sallusto und Lanzavecchia, 1995; Sallusto und Lanzavecchia 1994, Tedder und Zhou, 1996).

Auch bewirkt TNF-α die Entwicklung von dendritischen Zellen aus proliferierenden CD34$^+$ Vorläufern (Caux et al. 1992).

Die anfängliche Zugabe von TNF-α am ersten Kulturtag zeigte keine morphologische und funktionelle Reifung der dendritischen Zellen. Die Fähigkeit, T-Zellen in der allogenen MLR zu stimulieren ist im Vergleich zu in GM-CSF + IL-4 kultivierten Zellen immer signifikant geringer. Das konnten auch Sallusto et al. (1994) und Pickl et al. (1996) in Kulturen von dendritschen Zellen aus dem peripherem Blut die in GM-CSF + TNF-α kultiviert wurden, beobachten. Pickl et al. (1996) untersuchten in GM-CSF + TNF-α gezüchteten Zellen phänotypisch und dabei konnte keine CD83 Expression festgestellt werden.

Die unreifen dendritischen Zellen, die in GM-CSF + TNF-α kultiviert wurden zeigten ein sehr heterogenes Bild (Pickl et al., 1996). Die unreifen dendritischen Zellen in

GM-CSF + IL-4 + TNF-α zeigten zwei Hauptpopulationen: Zellagreggate bildende schwimmende DCs, die im Laufe der Kultur zerfielen und adhärende Zellagreggate („bad balls") die sich nicht in DCs entwickelten.

TNF-α und IL-4 scheinen auf die $CD14^+$ Zellen eine antagonistische Wirkung zu haben. Sie teilen die Population in zwei gegensätzliche Subpopulationen. Die Zellen, die auf den Einfluß von TNF-α ansprechen und leicht bis vollständig adhärieren bildeten eine Subpopulation. Die zweite Population wird von den schwimmenden DC-ähnlichen Zellen gebildet, die stark granuliert und mehr rund als polymorph sind und deren Stimulationsfähigkeit stark reduziert ist.

Zugabe von unterschiedlichen Zytokinen

Die jeweilige Zugabe von IL-13, IL-1β, IL-15 und IL-12 am d0, d2, d4 und d6 zu GM-CSF + IL-4 in die „priming culture" zeigte keine Reifung der dendritischen Zellen.

IL-13

Bei der Zugabe von IL-13 erhoffte man sich einen synergistischen Effekt mit IL-4, der vielleicht zu einer Reifung führt. Das konnte nicht bestätigt werden. Aus der Literatur ist ebenfalls nicht bekannt, daß IL-13 die Reifung der dendritischen Zellen induziert.

IL-1β

Die biologisch aktive Form von IL-1β ist ein 17 kD großes Polypeptid. Die wichtigste Funktion des IL-1β, ähnlich wie die des TNF-α, ist die Vermittlung einer Entzündungsantwort bei der natürlichen Immunität.

Die biologische Wirkung von IL-1β hängt von der freigesetzten Zytokinmenge ab; bei niedriger IL-1β Konzentration wirkt IL-1β hauptsächlich als Mediator der lokalen Entzündung. Wird es in großen Mengen sezerniert kommt es in den Blutstrom und entfaltet dort eine endokrine Wirkung.

Die Zugabe von IL-1β zur „priming culture" induzierte keine Reifung der dendritischen Zellen. Zwar wird die IL-1β mRNA Expression im Zuge der Reifung *in vitro* (Heufler et al. 1992) und *in vivo* (Enk und Katz, 1992) hochreguliert, doch induziert exogenes IL-1β in der anfänglichen Kultur diese vollständige Reifung nicht selbst.

IL-12

IL-12 ist ein 70 kD-Heterodimer, das aus zwei kovalent-gebundnene Polypeptid-Ketten besteht, von denen eine 35 kD (p35) und die andere 40 kD (p40) schwer ist. IL-12 wird typischerweise von Makrophagen in Antwort auf die Aufnahme von Mikroorganismen (Bakterien) sezerniert. IL-12 ist ein wichtiger Regulator der

Effektorphase der zellvermittelten Immunreaktionen. Diese Funktion kommt zustande, weil es direkt Effektorzellen aktivieren oder die Entstehung von anderen Zelltypen regulieren kann: z.B. ist IL-12 der stärkste Stimulator der NK-Zellen und stimuliert die Differenzierung der naiven $CD4^+$ T-Zellen zum T_H1-Subset.

Dendritische Zellen produzieren im Zuge ihrer Reifung große Mengen von IL-12 (Cella et al., 1996, Rieser et al. 1997) auch ohne in Kontakt mit mikrobiellen Stimuli zu kommen. Auch der Kontakt mit T-Lymphozyten induziert in dendritischen Zellen die IL-12 Synthese. Die notwendigen Signale werden dabei über zwei Moleküle vermittelt: CD40 und MHC Klasse II (Cella et al., 1997, Koch et al., 1996).

IL-12 wird zwar von reifenden DCs in großen Mengen gebildet aber IL-12 als Zytokinzusatz in der priming culture induziert keine Reifung der DCs.

IL-15

IL-15 hat keine Homologien zu IL-2 aber diese zwei Zytokine teilen viele biologische Aktivitäten aufgrund ihrer gemeinsamen Rezeptor-γ-Kette (Grabstein et al., 1994). IL-15 wird von verschiedenen Zelltypen produziert und IL-2 stammt hauptsächlich von T-Lymphozyten. Das und die weite Verbreitung der IL-15-Rα Kette, läßt vermuten, das IL-15 eine ganz andere physiologische Bedeutung hat als IL-2.

IL-15 wird von Monozyten und Makrophagen produziert (Doherty et al., 1996). Jonuleit et al. (1997a) zeigten, daß dendritische Zellen aus dem Blut IL-15 in RNA und Protein induzieren und daß IL-15 die akzessorische Funktion der dendritischen Zellen steigert (Jonuleit et al., 1995). Trotz dieser Eigenschaften induzierte IL-15 in dieser Arbeit als exogener Zusatz in der priming culture der dendritischen Zellen die Reifung nicht.

5.2.2. Induktion der Reifung während der differentiation culture

Um eine komplette Reifung zu erzielen, wurde die Kultivierung der dendritischen Zellen in zwei Phasen unterteilt, die „priming culture" und die „differentiation culture" (Romani et al. 1996, Bender et al., 1996). Nur zusätzliche Stimuli in der „differentiation culture" induzierten eine Reifung der dendritischen Zellen.

5.2.2.1. Bakterielle Stimuli

Bakterielle Stimuli wie SACS, BCG induzieren eine vollständige Reifung, LPS induziert eine teilweise Reifung

In früheren Arbeiten wurde beschrieben, daß durch die Stimulation mit LPS (Sallusto et al., 1995; Verhasselt et al., 1997) die Reifung von dendritischen Zellen über den CD14 abhängigen Weg induziert wird. In Antwort auf inflammatorische Mediatoren wie eben Lipopolysaccharid (LPS) und TNF-α beginnen die DCs zu wandern und „homen" zu den T-Zellarealen der sekundären lymphatischen Organe (Roake et al., 1995; De Smedt et al., 1996).

Auf Monozyten und Makrophagen ist CD14 der Rezeptor, der LPS bindet. Auf dendritischen Zellen scheint CD11c relevanter als CD14 zu sein (Ingalls and Golenbock, 1995), weil der CD14 Rezeptor im Zuge der „Transformation" von $CD14^+$ Monozyten zu DCs verloren geht.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß LPS im Gegensatz zu SACS und BCG keine vollständige Reifung der dendritischen Zellen induziert.

Frühere Arbeiten haben gezeigt, das humane Monozyten, die geringeren Dosen von LPS ausgesetzt wurden, bei einer zweiten Stimulation mit LPS eine stark verringerte Produktion von TNF-α und IL-10 aufwiesen (Randow et al., 1995). Deaktivierung von Monozyten durch Endotoxindesensibilisierung erscheint in Patienten mit septischen Erkrankungen und wird assoziiert mit chronischer Infektion und erhöhter Sterblichkeit (Döcke et al., 1997). Rieser et al. (1998) zeigten, daß diese LPS Toleranz in DCs dafür verantwortlich ist, daß der endgültige Reifungsschritt in der „differentiation culture" nicht stattfindet. LPS-desensibilisierte dendritische Zellen können CD83 nicht exprimieren und produzieren nur mehr geringe Mengen TNF-α und IL-12. Allerdings sind dendritische Zellen, die mit LPS stimuliert wurden, wie auch in dieser Arbeit gezeigt wurde, potente Stimulatoren der allogenen MLR; sie erreichen zwar nicht die Stimulationsfähigkeit von in MCM und mit

Bakterien gereiften Zellen, aber die Stimulationsfähigkeit ist größer als in GM-CSF + IL-4 (unreifen) dendritischen Zellen. Durch das unterschiedlich sezernierte Zytokinmuster von desensibilisierten DCs wird die T-Zelldifferenzierung beeinflußt und die T-Zellen entwickeln sich in Richtung Th2 Zellen. Bei limitierter DC-Anzahl nämlich wird IL-12 essentiell für die INF-γ Produktion (Bradley et al., 1996).

Der Endotoxingehalt unserer FCS-Chargen, die für die Kultur verwendet wurden ist sehr gering (< 0,1 ng/ml) und so findet die Desensibilisierung der Monozyten wohl eher *in vivo* statt. Sollte der Blutspender kürzlich mit inflammatorischen Mediatoren (z. B. während einer bakteriellen oder viralen Infektion) in Kontakt gekommen sein, würde die Zytokinproduktion der Monozyten *in vitro* (bei der Produktion des MCM) hinunterreguliert. Diese Monozyten sind *in vitro* sehr wohl noch in der Lage in unreife DCs zu differenzieren aber können durch Stimulation mit LPS nicht mehr vollständig reifen und es kommt zu vermehrten Zellsterben. Das könnte die immer wieder (auch von anderen Gruppen, die mit DCs arbeiten) beobachteten Qualitätsschankungen des MCM erklären.

Die Zugabe von SACS oder Bacillus Calmette-Guérin Mycobacteria (BCG) zu unreifen dendritischen Zellen in der „differentiation culture" führte zu einer kompletten Reifung der dendritischen Zellen. Die Reifung wurde nach vier folgenden Kriterien beurteilt: (1) die Zellen wurden zu großen polymorphen Zellen mit vielen beweglichen Plasmaausstülpungen, die ihnen ihr typisches dendritisches Aussehen geben, (2) keine Adhärenz an Plastik, (3) erhöhte Expression von MHC II und kostimulatorischen Molekülen, (4) Expression von CD83. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß SACS und BCG diese Änderungen des Phänotypes und der T-Zell-stimulatorischen Fähigkeit bewirken.

SACS, fixierte *Staphylococcus aureus*, sind gram-positive Bakterien, die als wichtigsten Virulenzfaktoren Oberflächenprotein A, Clumpingfaktor (Agglutination in Zitratplasma) und mitunter Polysaccharidkapseln besitzen. Erkrankungen erfolgen oft über Enterotoxine, z. B. Lebensmittelvergiftungen, Enterokolitis und toxisches Schocksyndrom.

Myobakterien sind langsam wachsende, aerobe fakultativ intrazelluläre Bakterien. Bei Bacille Calmette-Guérin (BCG) handelt es sich um einen attenuierten, avirulenten Stamm von *M. bovis*, der vor allem in Europa als prophylaktischer

Impfstoff eingesetzt wurde. *M. tuberculosis* produziert kein bekanntes Exo- oder Endotoxin.

Inaba et al. (1993) zeigten, daß nach Phagozytose von BCG durch dendritische Zellen die DCs reifen und zu wandern beginnen. Während der Migration verringert sich die Endocytose und das kostimulatorische Potential der Zellen erhöht sich. In den sekundären lymphatischen Organen (Lymphknoten und Milz) präsentieren sie wahrscheinlich den T-Zellen mycobakterielles Antigen (Inaba et al., 1993).

Die Stimulation mit SACS und BCG unterscheidet sich in ihrem Mechanismus grundlegend von einer Stimulation der dendritischen Zellen mit LPS. LPS-Stimulation erfolgt über den CD14 respektive über den CD11c – Weg und induziert so die Signaltransduktion.

SACS und BCG werden von den dendritischen Zellen über Phagocytose aufgenommen und verschiedene Rezeptorkomplexe. Membran-gebundene Proteine, inklusive dem Mannoserezeptor (Stahl, 1992; Ezekowitz et al. 1990), DEC-205 (Jiang et al., 1995) oder andere Lektin-ähnlichen Moleküle (Wu et al., 1996) funktionieren als „Nicht-Selbst-Erkennungs-Rezeptoren" („ pattern recognition receptors") auf der Oberfläche von dendritischen Zellen. Funktionelle Assays identifizierten kürzlich den Makrophagen-Mannoserezeptor auch auf DCs die aus Monozyten gewonnen wurden (Sallusto et al.; 1995, Caux et al., 1996). Dem DEC-205 Molekül auf der Oberfläche von dendritischen Zellen wird eine Glycan-Bindungs-Aktivität die mit CHO-Erkennungsdomänen gekoppelt ist, zugewiesen (Jiang et al., 1995). Auch kommen „scavenger" Rezeptoren zum Zuge, wie z. B. die zwei Klasse A Makrophagenrezeptoren SR-AI und SR-AII (Pearson, 1996), die zu einer Cystein-reichen Familie von Proteinen gehören (SRCR), die eventuell auch auf dendritischen Zellen exprimiert werden (Hughes et al., 1995). Dieser komplexe Vorgang der Endocytose und Rezeptorbindungen löst in den dendritischen Zellen die Reifung aus. Auch hier funktioniert TNF-α als wichtiger Mediator der inflammatorischen Stimuli und die Reifung der dendritischen Zellen wird hauptsächlich durch autokrine und parakrine Produktion von TNF-α initiiert. TNF-α veringert die Endozytose (Sallusto et al., 1995) und erhöht die Expression von CD83 und CD86 (Zhou und Tedder 1996). Außerdem unterstützt TNF-α die Migration (Roake et al., 1995; Steinman et al., 1995; Austyn, 1996, Cumberbatch et al., 1997, Stoitzner et al., 1997) der dendritischen Zellen und in Zuge dieser die Reifung.

5.2.2.2. Zytokincocktails in der „differentiation culture"

Zu Beginn der „differentiation culture" wurden zusätzlich zu GM-CSF + IL-4 verschiedene Zytokine zugegeben. Wie schon in der „priming culture" wurden IL-1β, TNF-α, beide Zytokine hier in unterschiedlich hohen Dosen, IL-1α, IL-6 und CD40 Ligand zuzugeben. In dieser Arbeit wurde gezeigt, das IL-1α in sehr hoher Dosis (10^4 U/ml) keine Reifung der dendritischen Zellen induzierte und IL-1β ab 500 U/ml zumindest CD115, den M-CSF Rezeptor, hinunterregulierte aber auch keine CD83 Expression induzierte. IL-1β und IL-1α allein als zusätzlicher Stimuli induzierten nie eine vollständige Reifung, selbst in sehr hohen Dosen. IL-6 wurde nur in Kombination mit TNF-α verwendet. Alle Kombinationen mit TNF-α induzierten eine komplette Reifung. Jedoch bereits 10ng/ml TNF-α allein induzierten eine vollständige Reifung.

Inflammatorische Stimuli, z.B. TNF-α und IL-1β, wurden beschrieben als verantwortliche Stimulantien der massiven MHC II –Biosynthese (Kämpgen et al. 1991, Puré et al. 1990) die im Zuge der Reifung von DCs erscheint (Cella et al., 1997). Diese Zytokine sind auch verantwortlich für das Abschalten der Makropinozytose (Sallusto et al., 1995). Während IL-1β von den dendritischen Zellen während der Reifung (Heufler et al., 1992) als Antwort auf inflammatorische Stimuli selbst produziert wird (Enk und Katz, 1992), werden z. B. in der Haut TNF-α und IL-1α von Keratinozyten als Antwort auf das „Gefahren-Signal", wie die Applikation von kontaktsensibilisierenden Haptenen, synthetisiert (Enk und Katz et al., 1992). Auch die Phagozytose von Bakterien oder löslichen bakteriellen Produkten (LPS) läßt DCs inflammatorische Zytokine produzieren: IL-1β (Henderson et al., 1997, Granucci et al., 1994, Kanangat et al., 1995), TNF-α (Henderson et al., 1997, Thurnher et al., 1997) und IL-6 (Riva et al., 1996). Das würde infizierte DCs oder DCs in mikrobiell infiziertem Milieu befähigen, die Reifung auf autokrine Weise zu induzieren.

CD40-Ligand war neben TNF-α der einzige Stimulus der allein als zusätzliches Zytokin zu GM-CSF + IL-4 zumindest ein teilweise Reifung induzierte. Der Reifungsmarker CD83 erhielt im FACS einen leichen Shift nach rechts, d.h.

31% ± 6% der sich im FSC/SSC eingegrenzten Zellen waren CD83 positiv. Ohne CD40-Ligand waren keine $CD83^+$ Zellen detektierbar.

Das CD40 Molekül wurde ursprünglich auf B-Zellen identifiziert und zeigte dort kostimulatorische Effekte (Clark und Ledbetter, 1986). Es ist ein 50 kD großes Glykoprotein das zur TNF-Rezeptorsuperfamilie gehört (Stamenkovic et al., 1989). Die Verwendung von CD 40-Fc Fusionsprotein ermöglichte die Isolation von cDNA die für CD40-Ligand (CD154) codiert; ein neues Mitglied der TNF Superfamilie das hauptsächlich auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird (Banchereau et al., 1994). Caux et al. (1994) zeigte, daß dendritische Zellen die aus CD 34^+ Zellen gewonnen wurden phänotypischen Veränderungen unterlagen, die einer Reifung ähnelten, wenn man sie mit CD-40-Ligand transfizierten Zellen inkubiert. Auch wurde bei CD40 aktivierten DCs aus $CD34^+$ Zellen die Sekretion von TNF-α, IL-8 und MIP-1α angeregt.

Eine Analyse der CD40/CD40L Interaktion deutet auf zwei Funktionen des CD40 Moleküls hin: (1) Signaltransduktion via CD40 wurde als der potenteste Stimulus identifiziert, um CD80/CD86 hochzuregulieren; (2) neben diesem Effekt hemmt löslicher CD40L und CD40-Ig Fusionsprotein die DC-Stimulation von allogenen T-Zellen (McLellan et al., 1996), wobei man vermuten könnte, daß die CD40/CD40L Interaktion ein zusätzliches kostimulatorisches Signal liefert.

Die stärkeren kostimulatorischen Signale und die vermehrte MHC Klasse II Expression (McLellan et al., 1996) auf den dendritischen Zellen zeigen in Richtung Reifung.

In meiner Arbeit reichte dieses Signal nicht, um eine vollständige Reifung zu induzieren. Möglich wäre, daß das lösliche Fusionsprotein nicht dasselbe Signal wie die Bindung einer CD40 L –exprimierende Zelle auslöst, einfach weil das Epitop des CD 40 Moleküls anders besetzt ist, bzw. eine sterische Hemmung stattfindet. Eine andere wahrscheinlichere Möglichkeit wäre die folgende: 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. So erscheint es nicht verwunderlich, daß die Stimulation mit Fc Fusionsprotein nur teilweise erfolgte. Tatsächlich fanden wir in Experimenten zur IL-12 Synthese, daß CD40-L-transfizierte Zellen zur Expression von CD83 führten, also Reifung induzierten (Diplomarbeit, B. Krösbacher, 1998). Eine weitere Möglichkeit wäre,

wie Ohshima et al. (1997) andeutet, daß die Kombination von löslichem CD40L und von anti-OX40L mAk nötig ist, um eine vollständige Reifung der dendritischen Zellen zu induzieren.

5.2.3. Monozyten-konditioniertes Medium (MCM), ein natürlicher Zytokincocktail

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß MCM der beste Stimulus ist, um dendritische Zellen zur Reifung zu bringen. Dies konnte morphologisch, phänotypisch und funktionell, sowohl mit allogenen, geprimten T-Zellen wie auch naiven T-Zellen aus dem Nabelschnurblut gezeigt werden.

MCM enthält eine natürliche Zusammensetzung von Zytokinen, deren Qualität experimentell nicht reproduziert werden konnte. Verschiedene Gruppen versuchten mit Hilfe von Zytokincocktails (Rieser et al.,1997; Jonuleit et al., 1997b) oder mit TNF-α alleine (Cella et al., 1994, Zhou und Tedder, 1996) den gleichen Effekt zu erzielen. Wichtig scheint auch der Unterschied zu sein, ob die dendritischen Zellen in FCS-haltigem oder FCS-freien Medium kultiviert wurden. Im FCS-haltigen Medium induziert TNF-α (Cella et al., 1994, Zhou und Tedder, 1996) eine „bessere" Reifung als im FCS-freien Medium (Reddy et al., 1997). Der detaillierte Vergleich von dendritischen Zellen die in MCM im Vergleich zu TNF-α gezüchtet wurden und der Unterschied von FCS-haltigem und FCS-freien Medien wird in einem späteren Kapitel diskutiert.

5.2.4. Kritischer Parameter: „MCM ist nicht MCM"

Mit Hilfe von ELISA wurden die Mengen von TNF-α, IL-1β, IL-12, IL-10 und Nitrit bestimmt. TNF-α mit Werten bis zu 5000 pg/ml und IL-1β bis zu 18 ng/ml wurden im FCS-haltigen MCMs ermittelt. Im FCS-freien MCM wurde weniger TNF-α nachgewiesen, aber genauso große Mengen von IL-1β. Die Menge an nachgewiesenem Nitrit korrelierte nicht mit der Qualität des MCMs. Auch konnte in einigen MCMs IL-12 nachgewiesen werden, aber die Neutralisation diese Faktors mit neutralisierenden Antikörpern (Bender et al., 1996), zeigte keine Wirkung auf die Reifung der dendritischen Zellen ebensowenig wie die Zugabe von IL-12. In einigen MCMs (serumfreien wie auch serumhaltigen) wurde IL-10 (58 pg/ml – 180 pg/ml) nachgewiesen. Die wichtigste

Funktion von IL-10 ist die Zytokinproduktion von Makrophagen/Monozyten zu hemmen und deren akzessorischen Funktion zu hemmen (Ding et al., 1993; Fiorentino et al., 1991, D`Andrea et al., 1993). Steinbrink et al. (1997) zeigten, daß unreife DCs durch IL-10 in ihrer funktionellen Fähigkeit und Reifung gehemmt wurden. Allerdings hatte IL-10 auf völlig ausgereifte DCs keine hemmende Wirkung. Auch ist die Wirkung von IL-10 konzentrationsabhängig (Steinbrink et al., 1997). Die hier gemessenen Mengen an IL-10 im MCM sind zu gering, um hemmend auf die Reifung der dendritischen Zellen zu wirken.

Reddy et al. (1997) identifizierten als verantwortliche Faktoren im MCM: TNF-α, IL-1β, IL-6 und INF-α. Kombinationen aus diesen konnten aber nur teilweise die Wirkung von MCM ersetzen. Mit großer Wahrscheinlichkeit befinden sich noch andere Komponenten im MCM, die bis jetzt noch nicht nachgewiesen wurden. MCM beinhaltet ebenfalls die Chemokine MIP-1α und RANTES (Reddy et al., 1997). Vielleicht ist ein neuer Faktor oder vielleicht ist es eine Kombination von neu produzierten Komponenten, die von den DCs während ihrer Reifung gebildet werden, verantwortlich für eine optimale Differenzierung der Zellen. Ein Kandidat wäre Transforming growth factor (TGF) -β1. Dieses Zytokin scheint, zumindest in der Maus, für die Entwicklung von Langerhanszellen entscheidend zu sein (Borkowski et al., 1996). Rezente Daten lassen vermuten, daß das auch bei humanen Blut-DCs so sein könnte (Geissmann et al., 1998). Es werden weitere Studien benötigt, um fest zustellen ob TGF -β1 im MCM vorhanden ist und ob es Einfluß auf die Reifung von DCs aus dem peripheren Blut hat. Auch darf man nicht vergessen, daß die B-Zellen zum Zytokincocktail im MCM beitragen.

Die Komplexität und Diversität von MCM macht es sehr schwierig, bis fast unmöglich, alle relevanten Komponenten zu identifizieren und deren Zusammenspiel zu durchleuchten.

Die „Qualität" unseres MCM unterlag großen Schwankungen. Zwar induzierten 70% der MCMs eine Reifung aber die restlichen 30% induzierten nur eine teilweise oder gar keine Reifung. Einerseits wurden also MCMs produziert, die keine Reifung induzierten und andererseits wurden so potente MCMs produziert, die man 2x hintereinander als Reifungsstimulus einsetzen konnte. Dieses verbrauchte MCM induzierte also, obwohl es schon drei Tage als Reifungsstimulus gedient hatte, bei erneuter Verwendung in einer anderen DC-Kultur wiederum mehr als 90% CD83 Expression.

Was bewirkte diese Unterschiedlichkeit?

Zwei Faktoren wurden untersucht, die Einfluß auf die Qualität des MCM hatten: (1) die Immunglobuline, die zur Aktivierung der Monozyten verwendet wurden, (2) Prostaglandinproduktion während der 24 Stunden Kulturdauer.

Die Qualität des MCM ist von der Charge des klinisch verwendbaren Immunglobulins, das zum Beschichten der Petrischalen verwendet wurde, abhängig. Genauso wie beim FCS, das als Proteinquelle für Medien dient, und je nach unterschiedlicher Charge das Wachstum der Zellen besser oder schlechter beeinflußt, unterschieden sich die Chargen des Immunglobulins für diesen Zweck. Um diesen Instabilitätsfaktor zu eliminieren, wurde eine Modifikation mit autologem Ig entwickelt, die diesen Unsicherheitsfaktor ausschließt (siehe Kapitel Adhärenzmethode).

Prostaglandine können inflammatorischen Signale wie IL-1, TNF-α oder LPS (Phipps et al., 1991) induzieren. Kalinski et al. (1997) zeigten, daß PGE_2 bei DCs, die in Gegenwart von GM-CSF + IL-4 kultiviert wurden, das Verschwinden der Expression von CD14 verhinderte. Jonuleit et al. (1997b) fand, daß die Wirkung von PGE_2 vom Reifungsgrad der dendritischen Zellen abhängt und von der Anwesenheit oder Abwesenheit von zusätzlichen Stimuli wie TNF und IL-1. Rieser et al. (1997) konnte zeigen, daß PGE_2 in Synergismus mit TNF-α DCs zu einer großen Produktion von IL-12 befähigt und die Reifung positiv beinflußt. Diese Daten lassen vermuten, daß Prostaglandin, das von aktivierten Monozyten produziert wird, ein wichtiger Faktor ist, der zur Qualität des MCMs beiträgt. In dieser Arbeit wurde versucht, die Prostaglandinproduktion im MCM durch Zugabe von Indomethazin, einem Hemmer der Prostaglandin-E-Synthese, zu inhibieren. Allerdings zeigte die Hemmung von PGE keinen konstanten Einfluß auf die Qualität des MCMs. Es gelang zwar durch Zugabe des Indomethazins die Qualität des MCMs negativ zu beeinflußen: d.h. die DCs, die mit diesem MCM behandelt wurden, reiften morphologisch nicht und exprimierten kein CD83. Allerdings trat dieser Effekt nicht bei allen Anwendungen des Indomethazins ein. Das bedeutet, daß auch die MCMs, die als Zusatz bei ihrer Produktion Indomethazin erhielten, die Reifung ohne PGE_2 induzierten. Da es keinen Hinweis darauf gibt, daß unreife DCs PGE selbst produzieren, kann PGE in diesen Fällen nicht der auslösende Faktor für die Reifung der DCs sein.

5.2.4. TNF-α als Reifungsstimulus im Vergleich mit MCM

TNF-α zeigte in der „priming culture" keine reifungsinduzierende Wirkung, sondern reduzierte die immunostimulatorische Fähigkeit T-Zellen in der allogenen MLR zu aktivieren.

Caux et al. (1992) und Reid et al. (1992) zeigten, daß TNF-α essentiell für die Gewinnung von DCs aus $CD34^+$ Vorläufern aus dem Knochenmark oder aus Nabelschnurblut ist. Dort wirkte TNF-α in Kombination mit GM-CSF.

Wie TNF-α in die Ontogenese von dendritischen Zellen *in vivo* involviert ist, ist bis dato nicht bekannt.

Die Zugabe von TNF (≥10 ng/ml) in der „differentiation culture" bewirkt eine Reifung nach allen Kriterien, zumindest in der FCS-haltigen Kultur. Diese TNF-α -Dosis ist sicher keine physiologische Menge dieses Zytokins. Durch ELISA wurde ermittelt, daß die höchste gemessen TNF-α -Dosis in einem einzelnen MCM zwar > 5 ng/ml war, allerdings bewegte sich durchschnittlich die TNF-α -Dosis zwischen 0,1 ng/ml bis 5 ng/ml. TNF-α alleine konnte mit diesen Mengen noch keine vollständige Reifung erzielen (Abb.41). D.h. MCM sowohl im FCS-haltigen als auch im FCS-freien System (Tab.10, Tab.11) kann mit einer 100fach (!) geringeren Menge an TNF-α eine vollständige Reifung der DCs induzieren. Auch in den von Jonuleit et al. (1997b) und von Rieser et al. (1997) verwendeten Zytokincocktails, die alle als wichtigen Bestandteil Prostaglandin E_2 enthalten, wurden 10 ng/ml TNF-α eingesetzt. Prostaglandin E_2 induziert zwar die Reifung nicht, verbessert allerdings die CD83 Expression der in TNF-α gereiften DCs (D. Dieckmann, persönl. Mitteilung).

Die Kriterien nach denen die Reifung beurteilt wurde sind wiederum (1) die Zellen wurden zu großen polymorphen Zellen mit vielen beweglichen Plasmaausstülpungen die den Zellen ihre typisches dendritisches Aussehen geben, (2) keine Adhärenz an Plastik, (3) erhöhte Expression von MHC II und kostimulatorischen Molekülen, (4) Expression von CD83.

5.2.5.1. Unterschiede im Phänotyp

In dieser Arbeit konnten Unterschiede von reifen DCs gezeigt werden, die entweder mit MCM oder mit TNF-α gereift wurden. Unterschiedlich war die Expression der Rezeptormoleküle CD87 und CD121a.

Rosettierte Zellen, die in MCM gereift wurden, exprimierten nur sehr wenig CD87 im Gegensatz zu in TNF-α gereiften Zellen. DCs, die mit der Adhärenzmethode gewonnen wurden, exprimieren sowohl bei einer Reifung mit MCM, als auch mit TNF-α geringfügig CD87. Pickl et al. (1996) konnte zeigen, daß unreife DCs, die mit TNF-α in der „priming culture" aktiviert wurden, ebenfalls CD87 exprimierten.

CD87, ist der Urokinase-Plasminogenaktivator (uPAR), eine wichtige Serin-Protease, die beim Abbau der extrazellulären Matrix mitwirkt. Sie wirkt als spezifischer Auslöser einer proteolytischen Kaskade: ihr unmittelbarer Angriffspunkt ist das Plasminogen, ein inaktiver Vorläufer einer Serin-Protease, der im Blut in großen Mengen vorkommt und sich an Orten der Gewebeneubildung ansammelt; z. B. in Wunden, Tumoren und entzündeten Stellen. Urokinase-Plasminogenaktivator spaltet eine einzige Bindung im Plasminogen und macht daraus die aktive Protease Plasmin. Anders als Plasminogen hat Plasmin ein breites Spezifitätsspektrum: es spaltet zahlreiche Proteine, darunter Fibrin (einen Bestandteil von Blutgerinnseln), Fibronectin und Laminin.

Diese enzymatische Aktivität von uPAR ist wichtig beim Durchbrechen von kollagenösen Barrieren, wie der epidermalen Basalmembran (Plow, et al., 1995; Stahl et al., 1994). Vorläufer von dendritischen Zellen müssen diese Barriere durchbrechen, wenn sie auf ihrem Weg in die Epidermis sind. Im Zuge des Reifungsprozesses durchbrechen Antigen-beladene LCs die Basalmembran wiederum auf ihren Weg zum Lymphknoten. Auch bei der Extravasation von Blutgefäßen muß die Basalmembran durchdrungen werden.

CD121a ist der Interkeukin-1-Rezeptor vom Typ I, der IL-1α und IL-1β bindet. Er gehört der Ig-Superfamilie an und wurde ursprünglich anhand einer T-Zellinie charakterisiert, wo er die IL-1 Stimulation vermittelt: er hat eine leicht höhere Affinität für IL-1β als für IL-1α. Der kD-Wert für die IL-1 Bindung an seine Rezeptoren kann bis zu 10^{-12} M betragen; trotzdem kann IL-1 bei sehr niedrigen Konzentrationen bis zu 10^{-15} M auf einigen Zielzellen aktiv sein, was darauf hinweist, daß noch andere IL-1-bindende Proteine existieren können. DCs die in TNF-α gereift wurden exprimierten viel CD121a im Gegensatz zu in MCM gereiften Zellen, die keinen CD121a exprimierten. Obwohl mittels ELISA im MCM große Mengen an TNF-α und IL-1β nachgewiesen wurden exprimieren die DCs nicht den IL-1-Rezeptor, der eine höhere Affinität für IL-1β hat. Möglich wäre, daß im MCM bis jetzt noch unbekannte Faktoren sind, die die Expression von CD121a hemmen. Eine verblüffend einfache, aber wahrscheinlichere Erklärung wäre, daß im MCM der IL-1 Rezeptor mit im MCM produzierten IL-1β besetzt ist und darum der mAk gegen den IL-1 Rezeptor an den DCs nicht binden kann.

5.2.5.2. Unterschiede in der MLR

In der Stimulationsfähigkeit von allogenen T-Zellen, wie auch von naiven T-Zellen aus der Nabelschur der dendritischen Zellen, die entweder in TNF-α oder in MCM kultiviert wurden, zeigte sich kein Unterschied.

Allerdings scheint die Reifung im Bezug auf die MLRs mit TNF-α nach dem „Hopp oder Tropp" System zu funktionieren. Wie man aus Tab.14 ersieht, induzieren sowohl TNF-α, als auch MCM in 10 Experimenten je 4x die beste Stimulationsfähigkeit. Wenn allerdings die in TNF-α gezüchteten DCs die größte Stimulationsfähigkeit aufwiesen, folgten MCM gezüchte Zellen immer als die am zweitbesten stimulierenden Zellen. Umgekehrt war das nicht so. In TNF-α gezüchtete dendritische Zellen lagen in denjenigen Versuchen, in denen MCM die größte Stimulationsfähigkeit induzierte, an dritter, vierter oder gar fünfter Stelle (Tab.14).

Es wurde auch versucht das Prozessieren der DCs, die entweder in MCM oder in TNF-α mit Tetanus Toxoid und Tetanus Toxoid spezifischen T-Zellklonen zu testen (Roosnek et al., 1988). Allerdings wurde durch eine starke Proliferation der T-Zellklone während der Züchtung derselben, die Tetanus Toxoid Spezifität offensichtlich verloren. So konnten diese Daten nicht ausgewertet werden. Aus der Literatur ist bekannt, daß in MCM gereifte DCs schlechter prozessieren als in GM-CSF + IL-4 gezüchtet Zellen (Romani et al., 1996). Umgekehrt scheinen in TNF-α gereifte Zellen besser zu prozessieren als unreife DCs (Sallusto et al., 1994). Der direkte Vergleich von in MCM und in TNF-α gereiften Zellen wurde nicht gezeigt. Somit bleibt diese wichtige Frage noch vollständig unbeantwortet.

5.2.5.3. Hemmung mit neutralisierenden Antikörpern gegen TNF-α

Die Reifung von dendritischen Zellen die in MCM reiften, konnte mit neutralisierenden Antikörper gegen TNF-α nicht vollständig verhindert werden. Dies zeigte auch Bender et al. (1996), der sowohl neutralisierende Antikörper gegen TNF-α wie IL-1β und IL-6 im MCM einsetzte.

Im Gegensatz dazu konnte die reifungsinduzierende Wirkung von TNF-α durch neutralisierende Antikörper gegen TNF-α vollständig geblockt werden. Thurnher et al. (1997) zeigten in ihrer Arbeit, daß neutralisierende Antikörper gegen TNF-α die reifungsinduzierende Wirkung von Bacillus Calmette-Guérin zwar etwas verringern, aber nicht aufheben konnten. Jonuleit et al. (1997b) und Rieser et al. (1997) propagieren die

Zugabe von PGE_2 zu TNF-α, und so können sie in den DCs den gleichen Reifungsgrad wie mit MCM erreichen. Diese Autoren zeigten jedoch nicht, ob die Wirkung ihrer Cocktails durch neutralisierende Antikörper gegen TNF-α vollständig oder teilweise blockiert werden kann. TNF-α scheint ein wichtiger reifungsinduzierender Faktor zu sein, da durch Blockade von TNF-α mit neutralisierenden Antikörpern ein Großteil der Reifung verhindert werden kann, allerdings wird die Reifung nicht komplett aufgehoben, wie bei einer Stimulation alleinig mit TNF-α.
Auch konnte ein Überschuß von TNF-α die Reifungsblockade, die neutralisierender Antikörper gegen TNF-α verursachte, aufheben, und zwar sowohl in der Konstellation MCM + anti TNF-α, als auch mit TNF + anti TNF-α. Ein Überschuß von IL-1β konnte den durch Antikörperneutralisation fehlenden TNF-α im MCM zumindest teilweise ersetzen. Funktionell ersetzte IL-1β den TNF-α sogar vollständig. Das unterstreicht die wichtige Rolle, die das Zytokin IL-1β neben (oder gemeinsam mit) TNF-α bei der Reifung spielt.

5.2.5.4. Stabilität von in MCM und in TNF-α gereiften Zellen

Im FCS-haltigen System konnte im Stabilitätstest kein Unterschied zwischen in MCM und TNF-α gereiften DCs festgestellt werden. Im FCS-freien System konnte gezeigt werden, daß die Reifung von dendritischen Zellen mit MCM ein irreversibler Vorgang ist. Im Gegensatz zu DCs, die mit TNF-α gereift wurden, adhärierten die MCM gereiften Zellen im Stabilitätstest nicht. Auch exprimierten die im MCM gereiften Zellen nach 48 Stunden ohne Zytokine immer noch CD83, was in TNF-α gereift Zellen nicht taten. Das heißt also, daß in dem der klinischen Anwendung näher stehendem System ohne FCS die Qualität der TNF-α-induzierten Reifung klar schlechter ist, als die MCM-induzierte Reifung.

Die Wirkungmechanismen von TNF-α und MCM unterscheiden sich: die Stimulation von dendritischen Zellen mit MCM scheint ein ähnlicher Vorgang zu sein, wie die bakterielle Stimulation durch SACS oder BCG, da sich diese induzierte Reifung nicht durch neutralisierende Antikörper gegen TNF-α vollständig hemmen läßt. Dies läßt stark vermuten, daß im MCM noch unbekannte Faktoren sind.

Die Reifung mit TNF-α ähnelt einer Reifung mit MCM durch die erhöhte Expression von MHC II und kostimulatorischen Molekülen und die Neo-Expression von

CD83. Sie unterscheidet sich aber in der Stabilität der Zellen, zumindest im FCS-freien System, und in der Expression von CD87 und CD121a.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit könnte man vermuten, daß TNF-α nur eine „stille" Reifung verursacht, d.h. es gibt kaum phänotypische und funktionelle Unterschiede zu MCM gereiften Zellen, wohl aber Unterschiede in der Stabilität der Zellen. MCM induziert die komplette Reifung, so wie die bakteriellen Stimuli SACS und BCG.

5.3. Unterschiedliche Reifungsstimuli in Hinblick auf klinische Verwendbarkeit

In Hinblick auf die klinische Verwendbarkeit müssen die DCs optimal und reproduzierbar zur Reifung gebracht werden. MCM ist zwar der Stimulus, der die maximale Reifung erzielt; es ist allerdings nicht 100% kontrollierbar. Die Verwendung von autologem Serum oder Plasma als Immunglobulinquelle zur MCM-Produktion erzeugte reproduzierbar Reifung-stimulierendes MCM. Allerdings wurde diese Methode bis jetzt nur mit gesunden Spendern getestet. Natürlich stellt sich die Frage, ob Tumorpatienten, die vielleicht schon eine Chemotherapie hinter sich haben, genauso „gutes" Serum oder Plasma besitzen, um ein ausreichend funktionierendes MCM zu produzieren. Vielleicht erfüllt auch kommerziell erhältliches Fremdserum oder -plasma diese Funktion, ohne die beschriebenen Chargenabhängigkeits-Probleme zu verursachen. Das wurde hier nicht getestet. Es bietet sich aber als Alternative an.

Dendritische Zellen, die in TNF-α gereift wurden, bieten sich als DCs für die Therapie nicht an. Dadurch, daß diese Zellen im Stabilitätstest im autologen System zu Vorläuferzellen revertieren, verlieren sie *in vivo* sehr wahrscheinlich alle Eigenschaften die man in einer Tumortherapie ausnützen will, nämlich Migrationsfähigkeit und T-Zell Stimulationsfähigkeit. Eine Alternative ist der von Jonuleit et al. (1997) verwendete Zytokincocktail, der Bestandteile vom MCM enthält; TNF-α/IL-1/IL-6 und PGE_2. Allerdings wurde TNF-α auch hier in einer sehr hohen Dosis verwendet, zu 10 ng/ml; bis zu 100 mal mehr (!) als in vielen maximal reifungsinduzierenden MCMs zu finden ist. Die Frage ist natürlich, ob DCs, die mit so hohen Dosen von TNF-α gereift wurden, auch lange genug im Körper des Patienten überleben, um ihre Arbeit zu verrichten, d.h. im Lymphknoten die antigenspezifischen T-Zellen zu sensibilisieren. In diesem Zusammenhang stellt sich auch die Frage, ob es nicht besser wäre, DCs zu spritzen, die beladen mit spezifischen Tumorantigenen, im „intermediate" Stadium ihrer

Differenzierung sind, um alle Fähigkeiten dieser effizienten Zellen zu nutzen (Antigenaufnahme, Antigenprozessierung, T-Zell-Sensibilisierungsfähigkeit). Allerdings besteht hier die Gefahr, daß die Zellen nicht stabil genug sind und zu Vorläufern revertieren oder durch IL-10 gehemmt werden. Wie man sieht, werfen sich immer noch genug Fragen auf, die man zu klären schon dabei ist. Dennoch sind die ersten Anwendungen der DCs in klinischen Studien schon im Gange.

Das Grundgerüst einer hoffentlich erfolgreichen Tumortherapie sind auf jeden Fall optimale dendritische Zellen, die stabil genug sind ihre „Reise" im Patienten zu überleben, ans Ziel zu kommen, ihr immunogenes Peptid nicht zu verlieren und maximale stimulatorische Fähigkeiten besitzen, um die vielleicht 100 T-Zellen zu finden, die alles ändern können!

6. Zusammenfassung

Dendritische Zellen sind auf die Einleitung primärer, durch T Lymphozyten vermittelter Immunantworten hochspezialisierte antigenpräsentierende Leukozyten. In den letzten Jahren wurden Methoden entwickelt, um dendritischen Zellen in großen Mengen aus monozytären Vorläuferzellen im peripheren Blut des Menschen zu züchten. Das hat ermöglicht, daß dendritische Zellen in zunehmendem Maße in klinischen, immuntherapeutischen Ansätzen verwendet werden. Die *Züchtungsmethoden* sind prinzipiell zwar schon etabliert. Viele wichtige Variable sind jedoch noch nicht optimiert. Ähnlich verhält es sich mit *der Reifung der dendritischen Zellen* (d.h. die Überführung der dendritischen Zellen aus dem Funktionszustand der optimalen Antigenaufnahme und des optimalen Antigenprozessierens in den Zustand der optimalen T Zell Sensibilisierungsfähigkeit) in diesen Zellkulturmodellen. Das entzündungsfördernde Zytokin Tumor Nekrosefaktor-α (TNF-α) wird vielfach zur Auslösung der Reifung eingesetzt. In unserem Labor wurden Monozyten-konditionierte Medien zu diesem Zweck verwendet. Detaillierte Vergleiche in Bezug auf die Qualität der Reifung, die mit den verschiedenen Mitteln erreicht wird, fehlen. Für diese Dissertation ergaben sich somit zwei wichtige Fragestellungen. *Erstens* sollte versucht werden, die Methodik zur Gewinnung der dendritischen Zellen aus menschlichem Blut einfacher und zuverlässiger zu machen. *Zweitens* sollten anhand der Kriterien Morphologie, Phänotyp, T Zell Stimulationsfähigkeit und Stabilität die verschiedenen Reifungsstimuli im Detail miteinander verglichen werden.

Eine veränderte Methode wurde etabliert: Sie beruht darauf, daß dieselben Monozyten (d.h. adhärenten peripheren Blut mononukleären Zellen / PBMC), die zu Beginn der 7 – 10 Tage dauernden Kultur für die Produktion der Monozyten-konditionierten Medien verwendet wurden, weiterkultiviert wurden und in dendritische Zellen umgewandelt wurden ("Adhärenzmethode"). Die bisherigen Methoden hatten diese Zellen nicht genutzt. Außerdem wurde die Beschichtung der Kulturgefäße mit spendereigenem Immunglobulin (d.h. Serum / Plasma) eingeführt und getestet. Das beseitigte das häufige auftretende Problem der schwankenden Qualität der konditionierten Medien, die durch unterschiedliche Chargen von kommerziellem Immunglobulin bedingt war. Die Kultur der adhärenten Zellen in Gegenwart der Zytokine Granulozyten-Makrophagen kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) und Interleukin-4 (IL-4) führte zu deren Ablösen vom Substrat und zur Ausbildung von Morphologie und Phänotyp dendritischer Zellen. Diese

Zellen konnten mit Monozyten-konditioniertem Medium zur Reifung gebracht werden (von Tag 7 auf Tag 10), so wie typischerweise für die anderen Züchtungsmethoden beschrieben: Sie waren dann hoch immunstimulatorisch für allogene ruhende T Lymphozyten (inklusive naiver T Zellen aus Nabelschnurblut), exprimierten u.a. den Reifungsmarker CD83 sowie das Kostimulatormolekül CD86 und waren negativ für den Rezeptor für den Makrophagen koloniestimulierenden Faktor (M-CSF) CD115. Im direkten Vergleich mit den bisherigen Methoden, die mit Lymphozyten-depletierten Populationen (durch Rosettierung mit Schaferythrozyten oder durch immunomagnetische Depletion via CD19 und CD2) beginnen, waren die Zellausbeuten vergleichbar. Ein wichtiger Unterschied war jedoch, daß dendritische Zellen bei der Adhärenzmethode dazu neigten, "vorzureifen": In 38% aller Experimente exprimierte ein beträchtlicher Prozentsatz der Zellen bereits CD83 (>20%). Die Methode eignet sich daher nicht für Experimente, wo exakt definierte unreife und reife Populationen von dendritischen Zellen miteinander verglichen werden sollen. Sie stellt aber eine einfache, effiziente, kostengünstige, reproduzierbare und vor allem klinisch verwendbare Methode dar, um *reife* dendritische Zellen und ihren Reifungsstimulus (d.h. Monozyten-konditioniertes Medium) von ein und demselben Spender / Patienten zu erhalten.

Der parallele Vergleich der Reifungstimuli TNF-α und Monozyten-konditioniertes Medium (sowie einer Reihe von Zytokincocktails und bakterieller Stimuli) zeigte in Gegenwart von fetalem Kälberserum (FCS) in den Kulturmedien keine funktionellen Unterschiede. Phänotypische Unterschiede wurden gefunden (CD87 / Urokinase Rezeptor, CD121a / IL-1 Rezeptor Typ I). In dem – klinisch wichtigeren – FCS-freien System war die Qualität der Reifung, die durch TNF-α (20ng/ml) alleine induziert wurde, funktionell schlechter: Diese dendritischen Zellen waren nicht stabil; sie revertierten nach Entzug der Zytokine zu adhärenten Monozyten. Die Analyse der Monozyten-konditionierten Medien mittels ELISA zeigte variable Mengen der Zytokine TNF-α (32 - >5000 pg/ml), IL-1ß (24 - >18000 pg/ml) und IL-10 (<180 pg/ml), sowie von Nitrit (1 – 17 µMol). Neutralisierende Antikörper gegen TNF-α konnten die die durch Monozyten-konditioniertes Medium induzierte Reifung zwar hemmen aber nie vollständig unterbinden. Aus diesen Daten kann geschlossen werden, daß das konditionierte Medium einen – noch unvollständig bekannten – optimalen Cocktail von Zytokinen enthält, der bislang in vitro nicht reproduziert werden konnte – auch in dieser Arbeit nicht. Die Daten unterstreichen weiters, daß für klinische Zwecke TNF-α nicht als alleiniger Reifungsstimulus genommen werden darf.

Summary

Dendritic cells (DCs) are increasingly being applied for clinical immunotherapy. Methods for the generation of DCs from human blood have been established and conditions for the maturation of DCs in culture have been defined. Yet, important methodical and biological questions still remain open. Two of them are addressed in this thesis: the development of an improved method and the detailed evaluation of TNF-α as a maturation stimulus for DCs in comparison with monocyte-conditined medium (MCM), bacteria and cytokine cocktails.

A major alteration to the original method was introduced and tested. The starting population of adherent blood monocytes, that was used for the production of MCM, was further utilized to generate DCs. To this end, the monocytes that adhered to immunoglobulin-coated dishes were further cultured in the presence of GM-CSF and IL-4. This led to detachment of the cells and to their acquisition of dendritic cell morphology and phenotype. Maturation could be induced in these DCs by the addition of MCM. Function, phenotype and morphology of these mature DCs was indistinguishable from DCs obtained by the other hitherto available approaches. Yields were also comparable. The simplicity (compared to more sophisticated lymphocyte depletion protocols) and the reproducibility (improved by a modification of immunoglobulin coating with autologous serum / plasma) of the modified method makes it well suited to serve as a protocol for the generation of *mature* DCs for immunotherapy. The method is not suitable, however, for comparative studies of immature and mature dendritic cells since populations of immature DCs (i.e. on day 7 of culture) often (38% of experiments) contained substantial subsets of already mature DCs (>20% CD83+ cells).

Maturation brought about by TNF-α (20 ng/ml) and MCM was similar in cultures containing fetal calf serum (FCS). Some phenotypical differences became evident, though (CD87, CD121a). In FCS-free cultures, however, MCM was clearly superior to TNF-α: The single cytokine was not able to render DCs stable. Upon withdrawal of cytokines the cells reverted to adherent monocytes. DCs that had matured in the presence of MCM were stable under these conditions. Analyses of MCM by means of ELISAs revealed variable amounts of TNF-α (32 - >5000 pg/ml), IL-1ß (24 - >18000 pg/ml), IL-10 (<180 pg/ml), and nitrite (1 – 17 µMol). Neutralizing antibodies to TNF-α inhibited but never completely blocked maturation induced by MCM. Therefore, it is concluded that TNF-α is an important mediator of maturation. The – still incompletely known - cytokine cocktail in MCM, however, is better and should preferentially be applied in clinical settings.

7. Literaturverzeichnis

1. ABBAS A. K., A. H. LICHTMAN AND J. S. POBER. 1996. Immunologie. Verlag Hans Huber, Bern.
2. ANDERSON D. M., E. MARASKOVSKY, W. L. BILLINGSLEY, W. C. DOUGALL, M. E. TOMESKO, E. R. ROUX, M. C. TEEPE, D. COSMAN AND L. GALIBERT. 1997. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. Nature 390: 175
3. AUSTYN J. M. 1996. New insights into the mobilization and phagocytic activity of dendritic cells. J. Exp. Med. 183: 1287
4. BANCHEREAU J. AND R. M. STEINMAN.1998. Dendritic cells and the control of immunity. Nature 392: 245
5. BANCHEREAU J., F. BAZAN, D. BLANCHARD, F. BRIÈRE, J. P. GALIZZI, C. VAN KOOTEN, Y. J. LIU, F. ROUSSET AND S. SAELAND. 1994. The CD 40 antigen and its ligand. Annu. Rev. Immunol. 52: 881
6. BENDER, A., M. SAPP, G. SCHULER, R. M. STEINMAN, AND N. BHARDWAJ. 1996. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. J. Immunol. Methods 196: 121
7. BHARDWAJ N., L. L. LAU, S. M. FRIEDMAN, M. K. CROW AND R. M. STEINMAN. 1989. Interleukin 1 production during accessory cell-dependent mitogenesis of T lymphocytes. J. Exp. Med. 169: 1121
8. BHARDWAJ N., S. M. FRIEDMAN, B. C. COLE AND A. J. NISANIAN. 1992. Dendritic cells are potent antigen-presenting cells for microbial superantigens. J. Exp. Med. 175: 267
9. BHARDWAJ N., U. SANTHANAM, L. L. LAU, S. B. TATTER, J. GHRAYEB, M. RIVELIS, R. M. STEINMAN, P. B. SEHGAL AND L. T. MAY. 1988. Interleukin 6/ Interferon –Beta2 in synovial effusions of patients with rheumatoid arthritis and other arthritides: Identification of several isoforms and studies of cellular sources. J. Immunol. 143: 2153
10. BORKOWSKI T. A., J. J. LETTERIO, A. G. FARR AND M. C. UDEY. 1996. A role for endogenous transforming growth factor β1 in Langerhans cell biology: The skin of transforming growth factor β1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells. J. Exp. Med. 184: 2417
11. BRADLEY L. M., D. K. DALTON AND M. CROFT. 1996. A direct role for INF-γ in regulation of Th1 cell development. J. Immunol. 157: 1350
12. CAUX C., B. VANBERVLIET, C. MASSACRIER, I. DURAND AND J.BANCHEREAU. 1996. Interleukin-3 cooperates with tumor necrosis factor α for the development of human dendritic/Langerhans cells from cord blood CD34+ hematopoietic progenitor cells. Blood 87: 2376
13. CAUX C., C. DEZUTTER-DAMBUYANT, D. SCHMITT AND J. BANCHEREAU. 1992. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. Nature 360: 258
14. CAUX C., C. MASSACRIER, B. VANBERVLIET, B. DUBOIS, C. VAN KOOTEN, I. DURAND, AND J. BANCHEREAU. 1994. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. J. Exp. Med., 180: 1263

15. CELLA, M., A.ENGERING, V. PINET, J.PIETERS, AND A. LANZAVECCHIA. 1997. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. Nature 388: 782
16. CHROMARAT P. AND J. BANCHEREAU. 1997 an update on interleukin-4 and ist receptor. Eur. Cytokine Netw. 8: 333
17. CLARK E. A. AND J. A. LEDBETTER. 1986. Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 4494
18. CUMBERBATCH M., R. J. DEARMAN, AND I. KIMBER. 1997. Langerhans cells require signals from both tumor necrosis factor-α and interleukin-1β for migration. Immunology 92: 388
19. D´ANDREA A., M. ASTE-AMAZAGA, N. M. VALIANTE, X. MA, M. KUBIN AND G. TRINCHIERI. 1993. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon γ-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. J. Exp. Med. 178: 1041
20. DE SMEDT T., B. PAJAK, E. MURAILLE, L. LESPAGNARD, E. HEINEN, P. DE BAETSELIER, J. URBAIN, O. LEO AND M. MOSER. 1996. Positive and negative regulation of dendritic cell function by lipopolysaccaride in vivo. J. Exp. Med. 184:1413
21. DE SMEDT T., M. VAN MECHELEN, G. DE BECKER, J. URBAIN, O. LEO AND M. MOSER. 1997. Effect of interleukin-10 on dendritc cell maturation and function. Eur. J. Immunol. 27: 1229
22. DEMOTZ S., H. M. GREY AND A. SETTE. 1990. The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. Science 249: 1028
23. DING L., P. S. LINSLEY, L. Y. HUANG, R. N. GERMAIN AND E. M. SHEVACH. 1993. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. J. Immunol. 151: 124
24. DÖCKE W. D., F. RANDOW, U. SYRBE, D. KRAUSCH, K. ASADULLAH, P. REINKE, H. D. VOLK AND W. KOX. 1997. Monoycte deactivation in septic patients: Restoration by INF-γ treatment. Nat. Med. 3: 678
25. DOHERTY T. M., R. A. SEDER AND A. SHER. 1996. Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages. J. Immunol. 156: 735
26. ENGEL P., J. G. GRIBBEN, G. J. FREEMAN, L. J. ZHOU, Y. NOZAWA, M. ABE, L. M. NADLER, H. WAKASA AND T. F. TEDDER. 1994. The B7-2 (B70) costimulatory molecule expressed by monocytes and activated B lymphocytes is the CD86 differentation antigen. Blood 84: 1402
27. ENK A. H. AND S. I. KATZ. 1992. Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1398
28. ENK A. H. AND S. I. KATZ. 1994. Heat-stable antigen is an important costimulatory molecule on epidermal Langerhans cell. J. Immunol. 152: 3264
29. EZEKOWITZ R. A. B., K. SASTRYH, P. BAILLY AND A. WARNER. 1990. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: Demonstration of multiple carbohydrate recognition-lie domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cell. J. Exp. Med. 172: 1785
30. FIORENTINO D. F., A. ZLOTNIK, T. R. MOSMANN, M. HOWARD AND A. O´GARRA. 1991. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. J. Immunol. 147: 3815

31. FREUDENTHAL P. S. AND R. M. STEINMAN. 1990. The distinct surface of human blood dendritic cells, as oberved after an improved isolation method. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 7698

32. GATELY M. K. AND R. CHIZZONITE. 1995. Measurement of human and murine IL-12. In Current Protocols in Immunology. J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. M. Margulies, E. M. Shevach, and W. Strober, editors. John Wiley & Sons, Inc. New York, NY. 6. 16.1-6.16.5.

33. GEISSMANN F., C. PROST, J.-P. MONNET, M. DY, N. BROUSSE AND O. HERMINE. 1998. Transforming Growth Factor β1, in the presence of Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor and Interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. J. Exp. Med. 187: 961

34. GERMAIN R. N. 1991. Antigen presentation. The second class story. Nature 352: 605

35. GRABSTEIN K. H., J. EISENMAN, K. SHANEBECK, C. RAUCH, S. SRINIVASAN, V. FUNG, C. BEERS, J. RICHARDSON, M. A. SCHOENBORN AND M. E. AHDIEH. 1994. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the β chain of the interleukin-2 receptor. Science 264: 965

36. GRANUCCI F., G. GIROLOMONI, M. B.LUTZ, M. FOTI, G. MARCONI, P. GNOCCHI, L. NOLLI AND P. RICCIARDI-CASTAGNOLI. 1994. Modulation of cytokine expression in mouse dendritic cell clones. Eur. J. Immunol. 24: 2522

37. HART D. N. J. AND J. L. MCKENZIE. 1988. Isolation and characterization of human tonsil dendritic cells. J. Exp. Med. 168: 157

38. HART D. N. J.. 1997. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. Blood 90: 3245

39. HENDERSON R. A., S. C. WATKINS AND J. A. L. FLYNN. 1997. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. J. Immunol. 159: 635

40. HEUFLER C., G. TOPAR, F. KOCH, B. TROCKENBACHER, E. KÄMPGEN, N. ROMANI AND G. SCHULER. 1992. Cytokine gene expression in murine epidermal cell suspensions: Interleukin 1β and macrophage inflammatory protein 1α are selectively expressed in Langerhans cells but are differentially regulated in culture. J. Exp. Med. 176: 1221

41. HUGHES D. A., I. P. FRASER AND S. GORDON. 1995. In vivo expression and function as a receptor for macrophage adhesion in lymphoid and non-lymphoid organs. Eur. J. Immunol. 25: 466

42. INABA K., G. SCHULER, M. D. WITMER, J. VALINSKY, B. ATASSI AND R. M. STEINMAN. 1986. The immunologic properties of purified Langerhans cells: distinct requirements for the stimulation of unprimed and sensitized T lymphocytes. J. Exp. Med. 164: 3347

43. INABA K., M. D. WITMER-PACK, M. INABA, S. K. HATHCOCK, H. SAKUTA, M. AZUMA, H. YAGITA, K. OKUMURA, P. S. LINSLEY, S. IKEHARA, S. MURAMATU, R. J. HODES AND R. M. STEINMAN. 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

44. INABA K., M. INABA, M. NAITO AND R. M. STEINMAN. 1993. Dendritic cells prognitors phagocytose particulates, including Bacillus Calmette-Guérin organisms, and sensitize mice to myobacterial antigens in vivo. J. Exp. Med. 178: 479

45. INABA K., N. ROMANI AND R. M. STEINMAN. 1989. An antigen-independent contact mechanism as an early step in T-cell proliferative responses to dendritic cell. J. Exp. Med. 170: 527

46. INGALLS R. R. AND D. T. GOLENBOCK. 1995. CD11c/CD18, a transmembrane signalling receptor for lipopolysaccaride. J. Exp. Med. 181: 1473

47. JIANG W., W. J. SWIGGARD, C. HEUFLER, M. PENG, A. MIRZA, R. M. STEINMAN AND M. C. NUSSENZWEIG. 1995. The Receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. Nature 375: 151

48. JONULEIT H., K. WIEDEMANN, G. MULLER, J. DEGWERT, U. HOPPE, J. KNOP AND A. H. ENK. 1997a. Induction of IL-15 messenger RNA and protein in human blood-derived dendritic cells. J. Immunol. 158: 2610

49. JONULEIT H., U. KÜHN, G. MÜLLER, K. STEINBRINK, L. PARAGNIK, E. SCHMITT, J. KNOP, AND A. H. ENK. 1997b. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. Eur. J. Immunol., 27: 3135

50. JONULEIT H., U. KÜHN, G. MÜLLER, M. WÖLFL, S. LOHMANN, J. SALOGA, D. BECKER, J. KNOP AND A. H. ENK. 1995. Keratinocyte-derived IL-15 enhances accessory functions of epidermal Langerhans cells and blood dendritic cell populations. Immunology 85:611

51. KALINSKI P., C. M. U. HILKENS, A. SNIJDERS, F. G. M. SNIJDEWINT AND M. L. KAPSENBERG. 1997. IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of Prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. J. Immunol. 159: 28

52. KÄMPGEN E., N. KOCH, F. KOCH, P. STÖGER, C. HEUFLER, G. SCHULER AND N. ROMANI. 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

53. KANANGAT S., S. NAIR, J. S. BABU AND B. T. TOUSE. 1995. Expression of cytokine mRNA in murine splenic dendritic cells and better induction of T cell-derived cytokines by dendritic cells than by macrophages during in vitro costimulation assay using specific antigens. J. Leukocyte Biol. 57: 310

54. KLEIJMEER M. J., V. M. J. OORSCHOT AND H. J. GEUZE. 1994. Human resident Langerhans cells display a lysosomal compartment enriched in MHC class II. J. Invest. Dermatol. 103: 516

55. KOULOVA L., E. A. CLARK, G. SHU AND B. DUPONT. 1991. The CD28 ligand B7/BB1 provides costimulatory signal for alloactivation of CD4 positive T-cell. J. Exp. Med. 173: 759

56. LANDRY D., M. LAFONTAINE, M. COSSETTE, H. BARTHELEMY, C. CHARTRAND, S. MONTPLAISIR AND M. PELLETIER. 1988. Human thymic dendritic cells. Characterization, isolation and functional assays. Immunol. 65: 135

57. LANIER L. L., S. O'FALLON, C. SOMOZA, J. H. PHILLIPS, P. S. LINSLEY, K. OKUMURA, D. ITO AND M. AZUMA. 1995. CD80 (B7) and CD86 (B70) provide simular costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. J. Immunol. 154: 97

58. LANZAVECCHIA, A. 1985. Antigen-specific interaction between T and B cell. Nature 314: 537

59. LECHLER, R. I. AND J. R. BATCHELOR. 1982. Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cell. J. Exp. Med. 155: 31

60. LUTZ M. B., GIROLOMONI G. AND P. RICCIARDI-CASTAGNOLI. 1996. The role of cytokines in functional regulation and differentation of dendritic cells. Immunobiol. 195: 431

61. MACKENSEN A., B. HERBST, G. KOHLTER, G. WOLFF-VORBECK, F. ROSENTHAL, H. VEELKEN, P. KULMBURG, H. E. SCHAEFER, R. MERTELSMANN AND A. LINDEMANN. 1995. Delineation of the dendritic cell lineage by generating large numbers of Birbeck granule-positive Langerhans cells from human peripheral blood prognitor cells in vitro. Blood 86: 2699

62. MCLELLAN A. D., R. V. SORG, L. A. WILLIAMS AND D. N. J. HART. 1996. Human dendritic cells activate T lymphocytes via a CD40: CD40 ligand-dependent pathway. Eur. J. Immunol. 26: 1204

63. MUELLER D. L., M. K. JENKINS AND R. H. SCHWARTZ. 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

64. NICOD L. P., B. GALVE-DE-ROCHEMONTEIX AND J. M. DAYER. 1990. Dissociation between allogeneic T cell stimulation and interleukin-1 or tumor necrosis factor production by human lung dendritic cells. AM. J. Resp. Cell & Molec. Biol. 2: 515 [abstract]

65. O'DOHERTY U., M. PENG, S. GEZELTER; W. J. SWIGGARD, M. BETJES, N. BHARDWAJ AND R. M. STEINMAN. 1994. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. Immunol. 82: 487

66. OHSHIMA Y., Y TANAKA, H. TOZAWA, Y. TAKAHASHI, C. MALISZEWSKI AND G. DELESPESSE. 1997. Expression and function of OX40 Ligand on human dendritic cells. J. Immunol. 159: 3838

67. PANCHOLI P., R. M. STEINMAN AND N. BHARDWAJ. 1991. An approach to isolating T cell lines that react to antigens presented on the surface of dendritic cells. Clin. Exp. Immunol. 85: 349

68. PANCHOLI P., R. M. STEINMAN AND N. BHARDWAJ. 1992. Dendritic cells efficiently immunoselect mycobacterial-reactive T-cells in human blood, including clonable antigen-reactive precursors. Immunol. 76: 217

69. PAVLI P., D. A. HUME, E. VAN DE POL AND W. F. DOE. 1993. Dendritic cells, the main antigen-presenting cells of the human colonic lamina propria. Immunol. 78: 132

70. PEARSON A. M. 1996. Scavenger receptor in innate immunity. Curr. Opin. Immunol. 8: 20

71. PHIPPS R. P., S. H. STEIN AND R. L. ROPER. 1991. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. Immunol. Today 12: 349

72. PICKL, W. F., O. MAJDIC, P. KOHL, J. STÖCKL, E. RIEDL, C. SCHEINECKER, C. BELLO-FERNANDEZ, AND W. KNAPP. 1996. Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14+ peripheral blood monocytes. J. Immunol. 157: 3850.

73. PIEMONTI L., S. BERNASCONI, W. LUINI, Z. TROBONJACA, A. MINTY, P. ALLAVENA AND A. MANTOVANI. 1995. IL-13 supports differentiation of dendritic cells from circulating precursors in concert with GM-CSF. Eur. Cytok. Netw. 6: 245

74. PIERRE P., S.J. TURLEY, E. GATTI, M. HULL, J. MELTZER, A. MERZA, K. INABA, R.M. STEINMAN, AND I. MELLMAN. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. 1997. Nature 388: 787

75. PIETERS J.. 1997. MHC class II restricted antigen presentation. Current Opinion in Immunology 9: 89

76. PLOW, E. F., T. HERREN, A. REDLITZ, L. A. MILES, AND J. L. HOOVER-PLOW. 1995. The cell biology of the plasminogen system. FASEB J. 9: 939

77. POPE, M., M.G.H. BETJES, H. HIRMAND, L. HOFFMAN, AND R.M. STEINMAN. 1995. Both dendritic cells and memory T lymphocytes emigrate from organ cultures of human skin and form distinctive dendritic-T-cell conjugates. J. Invest. Dermatol. 104: 11

78. PURÉ E., K. INABA, M. T. CROWLEY, L. TARDELLI, M. D. WITMER-PACK, G. RUBERTI, G. FATHMAN AND R. M. STEINMAN. 1990. Antigen processing by epidermal Langerhans cells correlates with the level of biosynthesis of major histocompatibility complex class II molecules and expression of invariant chain. J. Ex. Med. 172: 1459

79. RANDOW F., U. SYRBE, C. MEISE, D. KRAUSCH, H. ZUCKERMANN, C. PLATZER AND H. D. VOLK. 1995. Mechanism of endotoxin desensitization: Involvement of interleukin 10 and transforming growth factor β. J. Exp. Med. 181: 1887

80. REDDY A., M. SAPP, M. FELDMAN, M. SUBKLEWE, AND N. BHARDWAJ. 1997. A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells. Blood, 90: 3640

81. REID C. D. L., A. STACKPOOLE, A. MEAGER AND J. TIKERPAE. 1992. Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent $CD34^+$ progenitors in human bone marrow. J. Immunol. 149: 2681

82. REISER H., G. J. FREEMAN, Z. RAZI-WOLF, C. D. GIMMI, B. BENACERRAF AND L. M. NADLER. 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

83. RIESER C., C. PAPESH, M. HEROLD, G. BÖCK, R. RAMONER, H. KLOCKER, G. BARTSCH, AND M. THURNHER. 1998. Differential deactivation of human dendritic cells by endotoxin desensitization: role of tumor necrosis factor- and prostaglandin E2. Blood, 91: 3112

84. RIESER C., G. BÖCK, H. KLOCKER, G. BARTSCH, AND M. THURNHER. 1997. Prostaglandin E_2 and tumor necrosis factor α cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of interleukin 12 production. J. Exp. Med., 186: 1603

85. RIVA S., M. L. NOLLI, M. B. LUTZ, S. CITTERIO, G. GIROLOMONI, C. WINZLER AND P. RICCIARDI – CASTAGNOLI. 1996. Bacteria and bacterial well wall constituents induce the production of regulatory cytokines in dendritic cell clones. J. Inflamm. 46: 98

86. ROAKE J., A. S. RAO, P. J. MORRIS, C. P. LARSEN, D. F. HANKINS AND J. M. AUSTYN. 1995. Dendritic-cell loss from non-lymphoid tissue after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor and interleukin-1. J. Exp. Med. 181, 2237

87. ROMANI N., A. LENZ, H. GLASSEL, H. STÖSSEL, U. STANZL, O. MAJDIC, P. FRITSCH AND G. SCHULER. 1989. Cultured human Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotyp and function. J. Invest. Dermatol. 93: 600

88. ROMANI N., D. REIDER, M. HEUER, S. EBNER, E. KÄMPGEN, B. EIBL, D. NIEDERWIESER, AND G. SCHULER. 1996. Generation of mature dendritic cells from human blood - An improved method with special regard to clinical applicability. J. Immunol. Methods 196: 137

89. ROMANI N., G. SCHULER AND P. FRITSCH. 1991. Identification and phenotyp of epidermal Langerhans cells. In Schuler G. (ed) CRC Press, Boca Raton, pp 191

90. ROMANI N., K. INABA, M. D. WITMER-PACK, M. CROWLEY, E. PURE AND R. M. STEINMAN. 1989. A small number of anti-CD3 molecules on dendritic cells stimulate DNA synthesis in mouse T lymphozyten. J. Exp. Med. 169: 1153

91. ROMANI N., N. BHARDWAJ, M. POPE, F. KOCH, W. J. SWIGGARD, U. O'DOHERTY, M. D. WITMER-PACK, L. HOFFMAN, G. SCHULER, K. INABA, AND R. M. STEINMAN. 1997. Dendritic cells. In Weir's Handbook of Experimental Immunology. L. A. Herzenberg, D. M. Weir, L. Herzenberg, and C. Blackwell, editors. Blackwell Science, Oxford. 156.1-156.14.

92. ROOSNEK, E., S. DEMOTZ, G. CORRADIN, AND A.LANZAVECCHIA. 1988. Kinetics of MHC-Antigen complex formation on antigen-presenting cells. J. Immuno. 140: 4082

93. RUDENSKI A. Y., P. PRESTON-HURLBURT, S. C. HONG, A. BARLOW AND C. A. JANEWAY. 1991. Sequences analysis of peptides bound to MHC class II molecules. Nature 353: 622

94. SALLUSTO F., AND A. LANZAVECCHIA. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α. J. Exp. Med. 179: 1109

95. SALLUSTO, F., M. CELLA, C. DANIELI, AND A. LANZAVECCHIA. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: Downregulation by cytokines and bacterial products. J. Exp. Med. 182: 389

96. SARAYA K. AND C. D. L. REID. 1995 Stem cell factor and the regulation of dendritic cell production from CD34+ prognitors in bone marrow and cord blood. Br. J. Haematol. 93: 258

97. SCHULER G. AND R. M. STEINMAN. 1985. Murine epidermale Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. J. exp. Med. 161: 526

98. SCHULER G., 1991. In Epidermal Langerhans Cells. In Schuler G. (ed) CRC Press, Boca Raton

99. SCHULER G., N. ROMANI, H. STÖSSEL AND K. WOLFF. 1991. Structural organization and biological properties of epidermal Langerhans cells. Epidermal Langerhans cells. In Schuler G. (ed) CRC Press, Boca Raton, pp 87

100. STAHL P. D.1992. The mannose receptor and other macrophage lectins. Current Opin Immunol 4: 49

101. STAHL, A. AND B. M. MUELLER. 1994. Binding of urokinase to its receptor promotes migration and invasion of human melanoma cells in vitro. Cancer Res. 54: 3066

102. STAMENKOVIC I., E. A. CLARK AND B. SEED. 1989. A B-lymphocyte activation molekule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. EMBO J. 8: 1403

103. STEINBRINK K., M. WÖLFL, H. JONULEIT, J. KNOP, AND A. H. ENK. 1997. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. J. of Immunol. 159: 4772

104. STEINMAN R. M. AND J. W. YOUNG. 1991. Signals arising from antigen presenting cells. Current Opinion in Immunology 3: 361

105. STEINMAN R. M. AND K. INABA. 1989. Immunogenicity: role of dendritic cells. BioEssays 10: 145

106. STEINMAN R. M. AND Z. A. COHN. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. J. Exp. Med. 137: 1142

107.STEINMAN R. M., L. HOFFMAN AND M. POPE. 1995. Maturation and migration of cutaneous dendritic cells. J. Invest. Dermatol. 105: 2S

108. STEINMAN, R. M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu. Rev. Immunol. 9: 271

109.STINGL G. AND E. M. SHEVACH. 1991. Langerhans cells as antigen presenting cell. In Schuler G. (ed) CRC Press, Boca Raton, pp 159

110.STINGL G., E. WOLFF-SCHREINER, W. J. PICHLER, F. GSCHNAIT AND W. KNAPP. 1977. Epidermal Langerhans cells bear Fc and C3 receptors. Nature 268: 245

111.STOITZNER P., F. KOCH, K. JANKE AND N. ROMANI. 1997. Differential effects of TNF-α in the migration of murine Langerhans cells. J. Invest. Dermatol. 109: 265 [abstract]

112.STÖSSEL H., F. KOCH, E. KÄMPGEN, P. STÖGER, A. LENZ, C. HEUFLER, N. ROMANI AND G. SCHULER. 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

113.STROBL H., E. RIEDL, C. SCHEINECKER, C. BELLO-FERNANDEZ, W. F. PICKL, K. RAPPERSBERGER, O. MAJDIC AND W. KNAPP. 1996. TGFβ_1 promotes in vitro development of dendritic cells from $CD34^+$ hemopoietic prognitors. J. Immunol. 157: 1499

114.SUGAMURA K., H. ASAO, M. KONDO, N. TANAKA, N. ISHII, M. NAKAMURA AND T. TAKESHITA. 1995. The common γ-chain for multiple cytokine receptors. Adv. Immunol 59: 225

115.SYMINGTON F. W., W. BRADY AND P. S. LINSLEY. 1993. Expression and function of B7/BB1 on human epidermal Langerhans cells. J. Immunol. 150: 1286

116.SZABOLCS P., M. A. S. MOORE AND J. W. YOUNG. 1995. Expansion of immunostimulatory dendritic cells among the myeloid progeny of human CD34+ bone marrow precursors cultured with *c-kit* ligand, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and TNF-α. 154: 5851

117.TAKASHIMA A., D. EDELBAUM, T. KITAJIMA, R. K. SHADDUCK, G. L. GILMORE, S. XU, R. S. TAYLOR, P. R. BERGSTRESSER AND K. ARIZUMA. 1995. Colony-stimulating factor-1 secreted by fibroblasts promotes the growth of dendritic cell lines (XS series) derived from murine epidermis. J. Immuno. 154: 5128

118.TAKENAKA H., S. MARUO, N. YAMAMOTO, M. WYSOCKA, S. ONO, M. KOBAYASHI, H. YAGITA, K. OKUMURA, T. HAMAOKA, G. TRINCHIERI AND H. FUJIWARA. 1997. Regulation of T cell-dependent and –independent IL-12 production by the three Th2-type cytokines IL-10, IL-6, and IL-4. J. Leukocyte Biol. 61: 80

119.TEUNISSEN M. B. M., J. WORMMEESTER S. R. KRIEG, P. J. PETERS, I. M. C. VOGELS, M. L. KAPSENBERG AND J. D. BOS. 1990. Human epidermal Langerhans cells undergo profound morphological changes during in vitro culture. J. Invest. Dermatol. 94: 166

120.THURNHER M., C. PAPESH, R. RAMONER, G. GASTL, G. BÖCK, C. RADMAYR, H. KLOCKER AND G. BARTSCH. 1997. In vitro generation of $CD83^+$ human dendritic cells for the active tumor immunotherapy. Exp. Hematol. 25: 232

121.THURNHER M., R. RAMONER, G.GASTL, C. RADMAYER, G. BÖCK, M. HEROLD, H. KLOCKER, AND G. BARTSCH. 1997. Bacillus Calmette-Guérin mycobacteria stimulate human blood dendritic cells. Int. J. Cancer, 70: 128

122. TRACEY, K. J., H. W. KIRK, K. R. MANOGUE, Y, FONG, D. G. HESSE, H. T. NGUYEN, G. C. KOU, B. BEUTLER, R. S. COTRAN, A. CERAMI, AND S. F. LOWRY. 1988. Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia and inflammation . J. Exp. Med. 167: 1211

123. VAN VOORHIS W. C., J. VALINSKY, E. HOFFMAN, J. LUBAN, L. S. HAIR AND R. M. STEINMAN. 1983. Relative efficacy of human monocytes and dendritic cells as accessory cells for T cell replication. J. Exp. Med. 158: 174

124. VERHASSELT V., C. BUELENS, F. WILLEMS, D. DE GROOTE, N. HAEFFNER-CAVAILLON AND M. GOLDMAN. 1997. Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells – Evidence of a soluble CD14-dependent pathway. J. Immunol. 158: 2919

125. WILKINSON, V. L., R. R. WARRIER, T. P. TRUITT, P. NUNES, M. K. GATELY, AND D. H. PRESKY. 1996. Characterization of anti-mouse IL-12 monoclonal antibodies and measurement of mouse IL-12 by ELISA. J. Immunol. Meth. 189: 15

126. WONG B. R., R. JOSIEN, S. Y. LEE, B. SAUTER, H. L. LI, R. M. STEINMAN AND Y. CHOI. 1997. TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induces cytokine), a new TNF family member predominantly expresses in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. J. Exp. Med. 186: 2075

127. WU K., J. YUAN AND L. A. LASKY. 1996. Characterization of a novel member of the macrophage mannose receptor type C lectin family. J. Biol. Chem . 271: 2132

128. YAMAGUCHI Y., H. TSUMURA, M. MIWA AND K. INABA. 1997. Contrasting effects of TGF-β1 and TNF-α on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow. Stem Cells 15: 144

129. YOUNG J. W., L. KOULOVA, S. A. SOEGEL, E. A. CLARK, R. M. STEINMAN AND B. DUPONT. 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

130. YOUNG J. W., L. KOULOVA, S. A. SOERGEL, E. A. CLARK AND R. M. STEINMAN. 1992. The B7/BB1 antigen provides one of several costimulatory signals for activation of CD4+ T lymphocytes by human blood dendritic cells in vitro. J. Clin. Invest. 90: 229

131. YOUNG J. W., P. SZABOLCS AND M. A. S. MOORE. 1995. Identification of dendritic cell colony-forming units among normal human CD34+ bone marrow progenitors that are expanded by c-kit ligand and yield pure dendritic cell colonies in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor α. J. Exp. Med. 182: 1120

132. ZHOU, L. J. AND T. F. TEDDER. 1996. $CD14^+$ blood monocytes can differentiate into functionally mature $CD83^+$ dendritic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 2588

133. ZHOU, L.-J. AND T. F. TEDDER. 1995. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. J. Immunol. 154: 3821

134. ZVAIFLER N. J., R. M. STEINMAN, G. KAPLAN, L. L. LAU AND M. RIVELIS. 1985. Identification of immunostimulatory dendritic cells in the synovial effusions of patients with rheumatoid arthritis. J. Clin. Invest. 76: 789

8. Anhang

Publikationsliste

Ebner S., A. Lenz, D. Reider, P. Fritsch, G. Schuler and N. Romani. 1997. Expression of maturation-/migration-related molecules on human dendritic cells from blood and skin. Immunobiol. 198: 568 – 587

Eibl B., S. Ebner, C. Duba, G. Böck, N. Romani, M. Erdel, A. Gächter, D. Niederwieser and G. Schuler. 1997. Dendritic cells generated from blood precursors of chronic myelogenous leukemia patients carry the Philadelphia translocation and can induce a CML-specific primary cytotoxic T-cell response. Genes Chromosomes Cancer 20: 215 – 223

Thurnher M., C. Radmayr, S. Ebner, G. Böck, H. Klocker, N. Romani and G. Bartsch. 1996. Human renal cell carcinoma tissue contains dendritic cells. Int. J. Cancer 67: 1-7

Thurnher M., H. Klocker, C. Papesh, R. Ramoner, C. Radmayr, A. Hobisch, G. Gastl, N. Romani, S. Ebner, G. Böck and G. Bartsch. 1997. Dendritic cells for the immunotherapy of renal cell carcinoma. Urol. Int. 59: 1 – 5

Poster:

Ebner S., Reider D., Heuer M., Schuler G. and N. Romani. Expression of CD83 and lack of CD115 are phenotypical hallmarks of mature human dendritic cells. Jährliches Treffen der österreichischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie. Wien, November 1996. **Poster Preis!**

Ebner S., Reider D., Heuer M., Schuler G. and N. Romani. Expression of CD83 and lack of CD115 are phenotypical hallmarks of mature human dendritic cells. In *Ricerca Scientifica ed Educazione Permanente, Periodico dell'Università di Milano*, Supp. 104:60, 1996; (4th International Symposium on Dendritic cells in Fundamental and Clinical Immunology, Venezia, October 1996)

Ebner S. and N. Romani. Expression of molecules involved in maturation and migration of human dendritic cells from blood. Jährliches Treffen der österreichischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie. Innsbruck, November 1997

Krösbacher B., Ratzinger G., Ebner S., Fritsch P. and N. Romani. Differential production of IL-12 by immature and mature dendritic cells from blood. Jährliches Treffen der österreichischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie. Innsbruck, November 1997

Winklehner-Jennewein P., Ebner S., Neyer S., Brenner J., Romani N. and C. Heufler. Isolation of a novel putative transcription factor in mature dendritic cells. Jährliches Treffen der österreichischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie. Innsbruck, November 1997

Koch F., Janke K., Ebner S., Ryffel B. and N. Romani. The role of TNF-α in the maturation of maturation of dendritic cells from muine bone marrow. Arch. Dermatol. Res. 123, 1998