

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

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

Ratzinger, Gudrun

1996

III. Resultate

III. RESULTATE

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

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

1. Die Gewinnung und Kultivierung dendritischer Zellen aus humanem Blut

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

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

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

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

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

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

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

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

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

B. Unterschiede der verschiedenen Depletionsmethoden

*** Immunomagnetische Depletion mit Hilfe von Dynabeads**

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

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

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

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

C. Einfluß von MCM auf die Ausreifung dendritischer Vorläuferzellen

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

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

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

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

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

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

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

Abbildung 3. 1

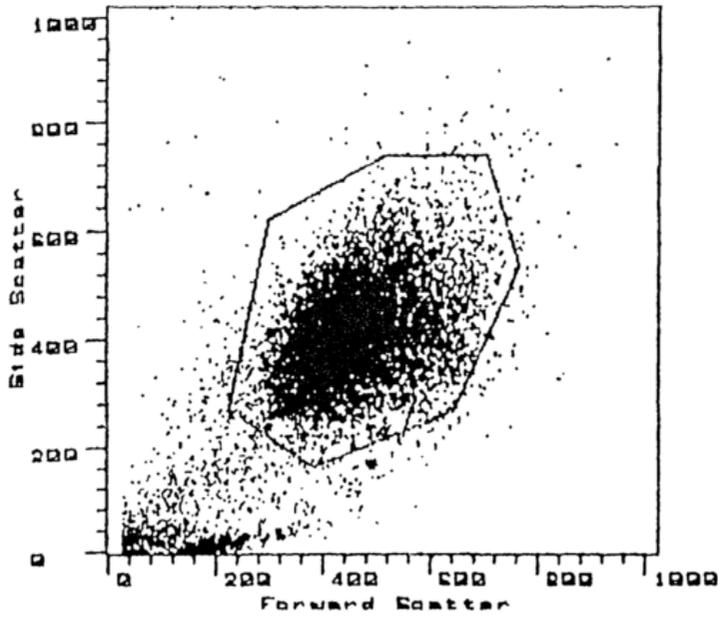


Abbildung 3. 2

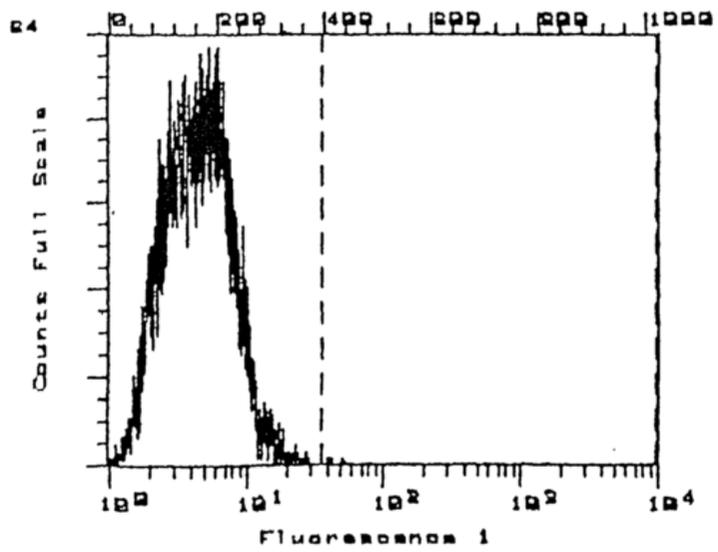
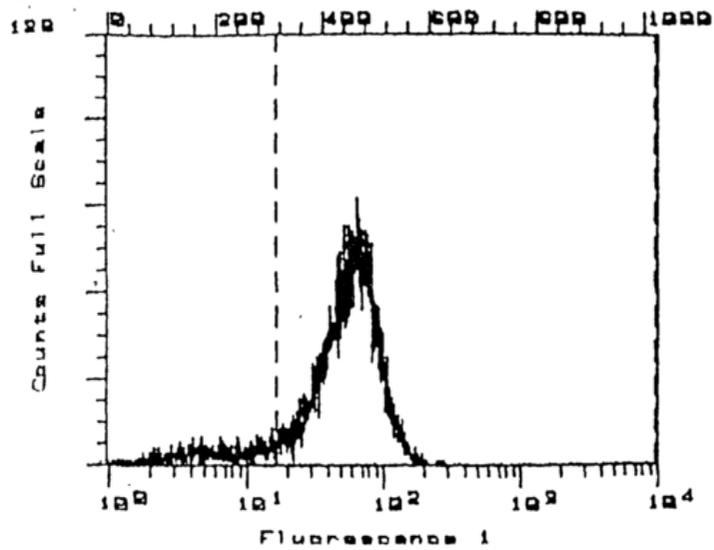


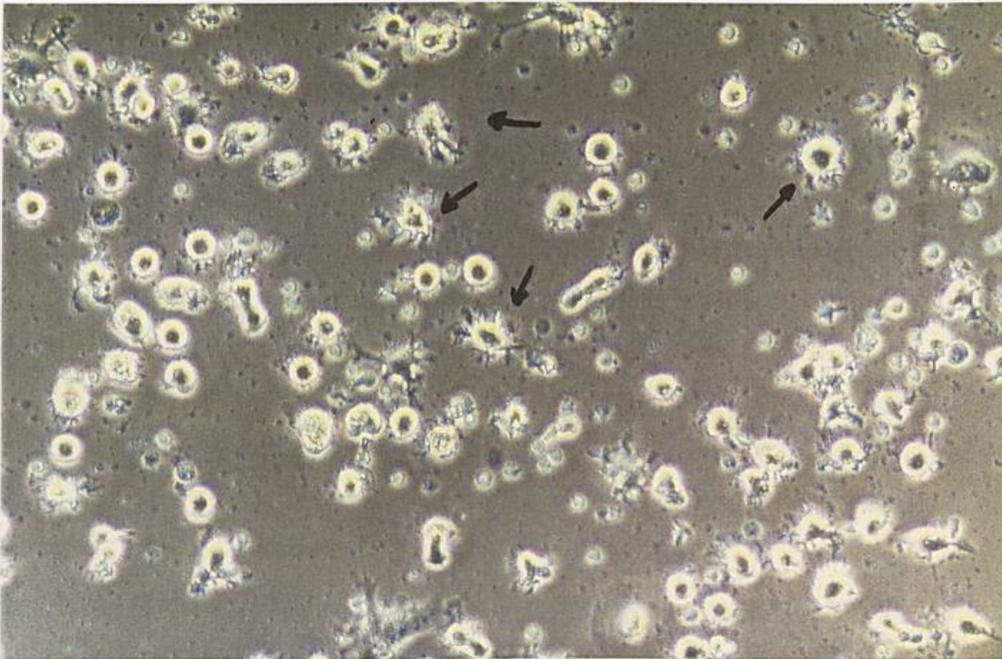
Abbildung 3. 3



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

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

Abb. 3.4



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

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

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

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

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

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

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

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

Die anschauliche Darstellung dieser Daten erfolgt in der Tabelle 3.1.

Tabelle 3.1

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

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

unreife DZs

reife DZs

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

In der Tabelle 3.2 wird dieser Sachverhalt anschaulich dargestellt.

Tabelle 3.2

Dendritische Zellen produzieren IL-12 als Antwort auf SACS

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

unreife DZs

reife DZs

Legende:

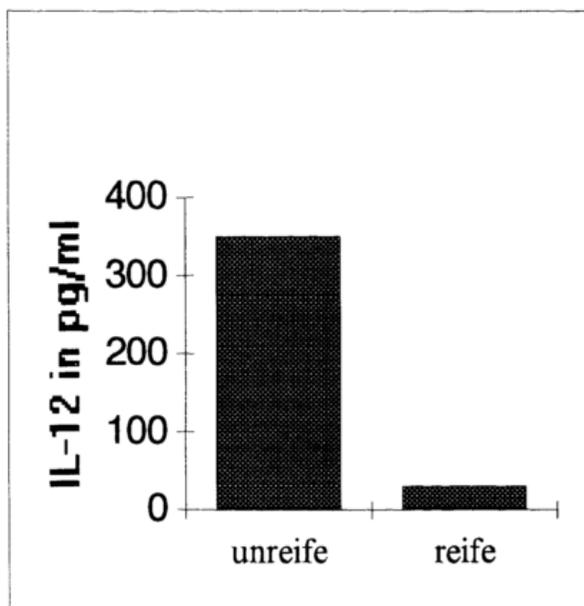
Der Stimulus SACS ruft bei dendritischen Zellen unterschiedliche Antworten hervor in Abhängigkeit der Intensität des Stimulus und des Reifungsgrades der Zellen.

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

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

Unreife DZs sind wesentlich besser stimulierbar.

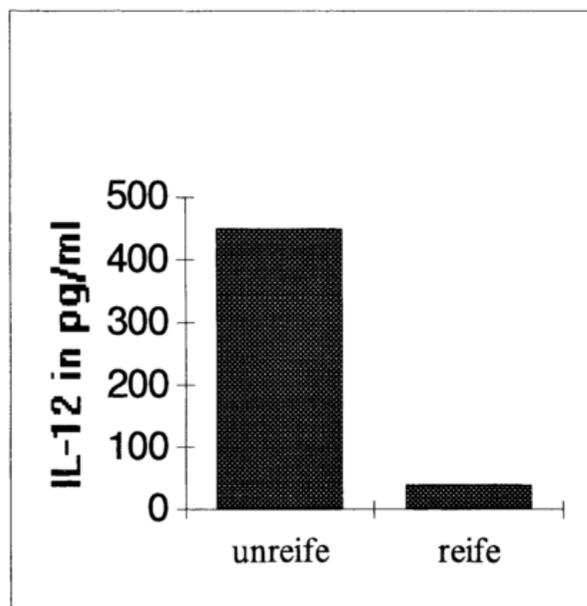
Durch die Summation aller Einzelerperimente wird dieser Sachverhalt in den nachfolgenden Abbildungen 3.5 und 3.6 anschaulich dargestellt. Unreife dendritische Zellen sezernieren 10 - 15mal mehr Interleukin 12 als reife dendritische Zellen.



Legende:

Stimulation durch Anti-CD40-Antikörper

Abb. 3.5



Stimulation durch SACS

Abb. 3.6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3. Nachweis der Migration von humanen dendritischen Zellen im Mausmodell

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

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

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

A. Intravenös verabreichte humane dendritische Zellen wandern in die Milz

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

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

2 % aus.

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

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

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

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

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

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

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

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

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