universität innsbruck
Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

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

Ratzinger, Gudrun

1996

IV. Diskussion

urn:nbn:at:at-ubi:2-12547

IV. DISKUSSION

Ich möchte dieses Kapitel in zwei Abschnitten erörten:

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

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

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

A. Humane dendritische Zellen produzieren substantielle Mengen von IL-12 in Antwort auf die Bindung des CD40 Moleküls.

B. Unreife dendritische Zellen können zur Sekretion deutlich größerer Mengen von IL-12 angeregt werden als reife dendritische Zellen.

A. Der CD40 Weg der IL-12-Stimulation

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Nachweis der Migration humaner dendritischer Zellen im Mausmodell

A. Intravenös verabreichte humane dendritische Zellen wandern in die Milz

Austyn et al.(26) zeigten in ihren Studien, daß intravenös verabreichte murine dendritische Zellen sich nach 24h in den T-Zell-abhängigen Arealen der weißen Pulpa wiederfinden. In Anlehnung an diese Feststellung beobachtete ich die Wanderung von humanen intravenös applizierten DZs im Mausmodell.
Sowohl in den Gefrierschnitten als auch in den Milzzellsuspensionen konnten applizierte Zellen, die zuvor Fluoreszenz-markiert worden waren, beobachtet werden. In den Schnitten konnte eine deutliche Anreicherung in der weißen Pulpa und in der Marginalzone festgestellt werden.

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

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

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

fluoreszenz abgegrenzt werden, die Intensität war jedoch im Vergleich zu den Milzzellsuspensionen wesentlich geringer.

Mögliche Ursachen:

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

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

C. Klinische Relevanz der Migration applizierter dendritischer Zellen

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

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

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

UB

Zusammenfassung:

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

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

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

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

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

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

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

* Intravenös verabreichte humane DZs wandern in die Milz. Die Auffindung der humanen DZs wurde durch Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff ermöglicht.

* Subkutan verabreichte humane DZs wandern in die regionalen Lymphknoten. Die Ergebnisse dieser Experimente waren jedoch nur schwach positiv.

* Migration ist notwendig, wenn erwogen wird, dendritische Zellen im Rahmen einer Tumortherapie einzusetzten. Diese Arbeit zeigt, daß das xenogene Mausmodell grundsätzlich zum Studium des Wanderungsverhaltens humaner dendritischer Zellen geeignet ist.

Summary:

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

Dendritic cell function can be considered in three parts:

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

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

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

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

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

* Intraveneoulsly applicated human DCs can be found again in the spleen. The cells have been marked with a fluorescent cell linker kit.
* Subcutaneously applicated human DCs can be found again in the regional lymph nodes. Unfortunately the results of these experiments were only weak positiv.
* In principle the mouse is an appropriate modell for studying the migration of human DCs.