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

4. Ergebnisse

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

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

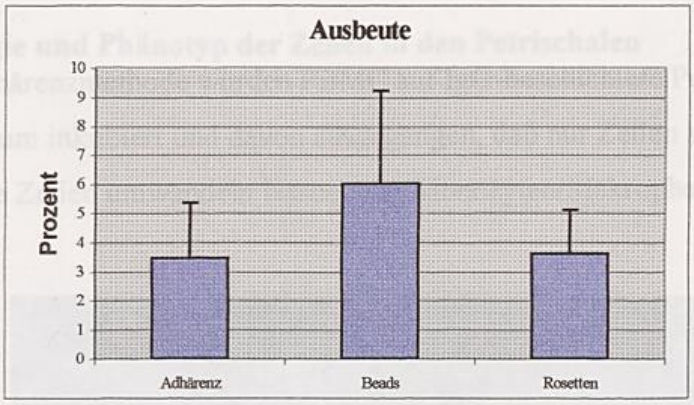


Abb.5: Vergleich der Ausbeuten am d10 – d12 von unreifen und reifen DCs mit drei unterschiedlichen Methoden der DC-Gewinnung. Die Ausbeute wurde als Prozentsatz der Zahl der Ausgangs-PBMC dargestellt Standardabweichungen sind dargestellt.

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.

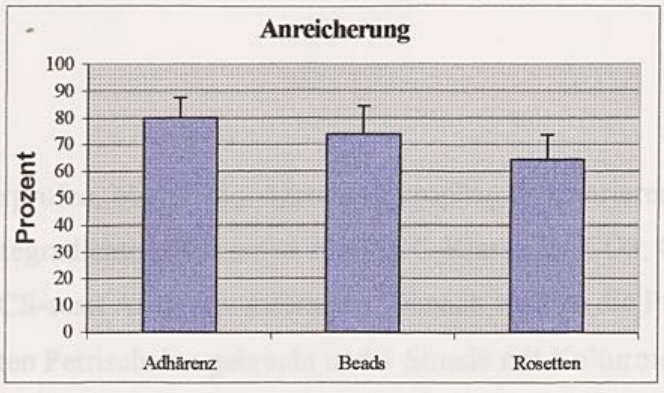


Abb.6: Vergleich des Prozentsatzes der DCs von allen viablen Zellen (d.h. Anreicherung) DCs am d10-d12, die mit drei unterschiedlichen Methoden gewonnen wurden. Der Wert gibt den Prozentsatz der Zellen mit typischer Morphologie an (große Zellen, unregelmäßig geformt).

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).

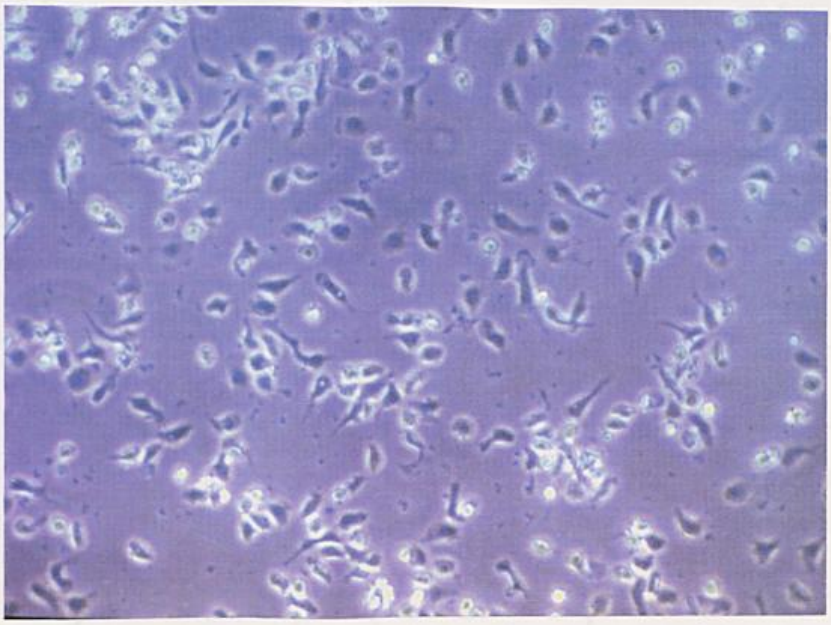


Abb.7: Auf einer mit IgG-beschichteten Petrischale adhärierende Monozyten/Makrophagen. Die Petrischale wurde mit IgG beschichtet und mit 50 x 10^6 PBMC 1 Stunde in Kulturmedium inkubiert und nicht adhärente Zellen wurden weggewaschen.

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).

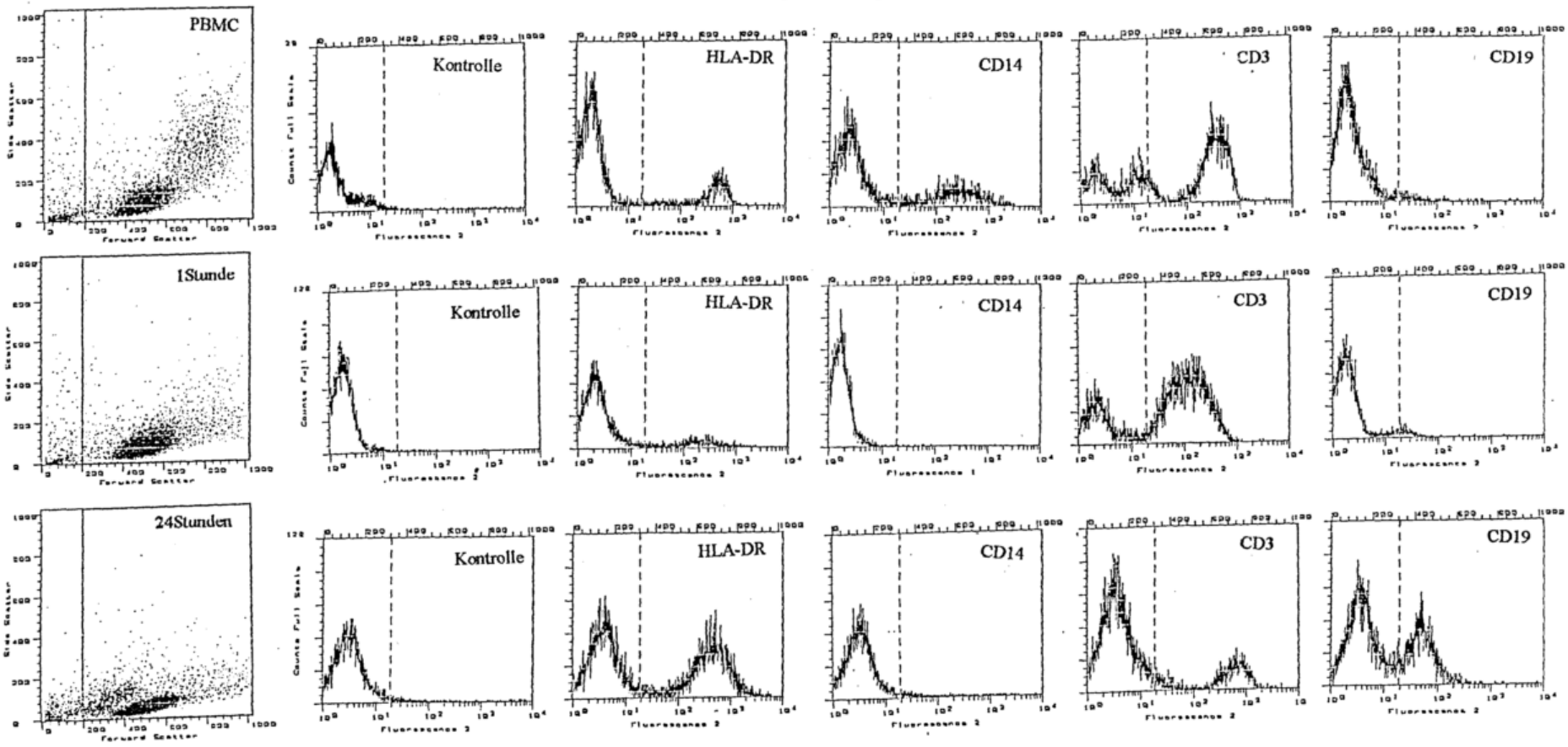


Abb.8: FACS-scan Analysen der PBMC (oben) und der Zellen im Überstand 1 Stunde nach Inkubation (Mitte) und 24 Stunden nach Inkubation (unten). Die Analysen wurden bei 3 Experimenten durchgeführt, eines davon ist hier dargestellt. Die Histogramme stellen im FSC/SSC gegateten Zellen dar. Dieses Gate schließt 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).

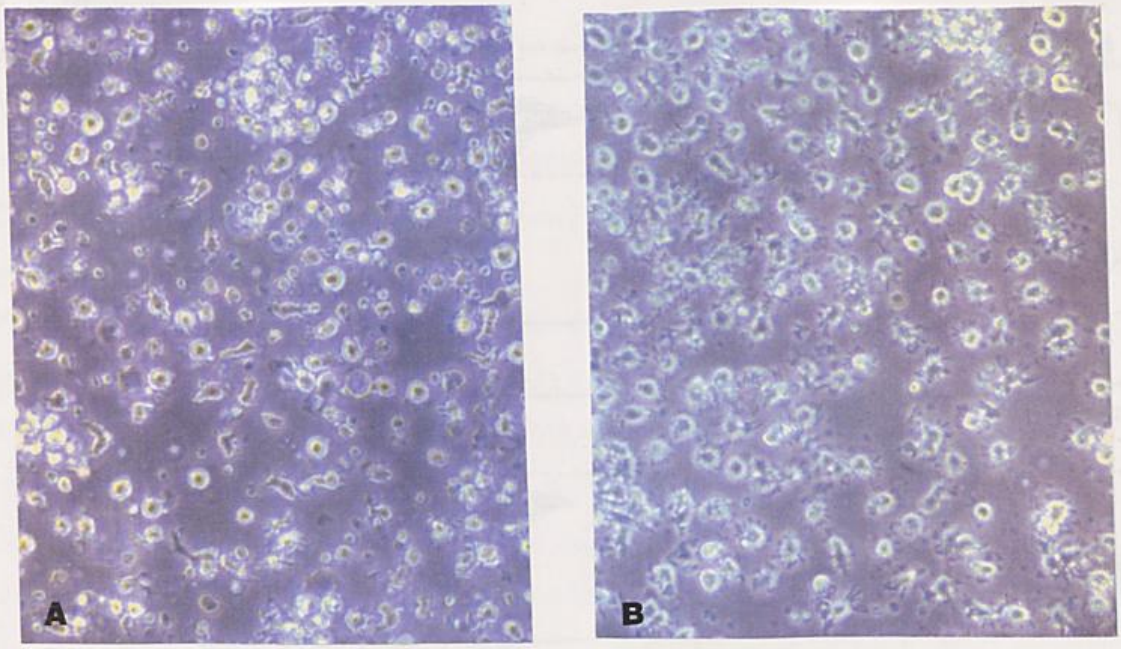


Abb.9: (A) Morphologie von DCs die in R10+GM-CSF+IL-4 mit der Adhärenzmethode kultiviert wurden = unreife DCs. (B) Morphologie von DCs die mit MCM im FCS-haltigen Kulturmedium zur Reifung gebracht wurden. Man beachte die polymorphe Form und die ausgeprägt langen zytoplasmatischen Ausstülpungen/Segel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

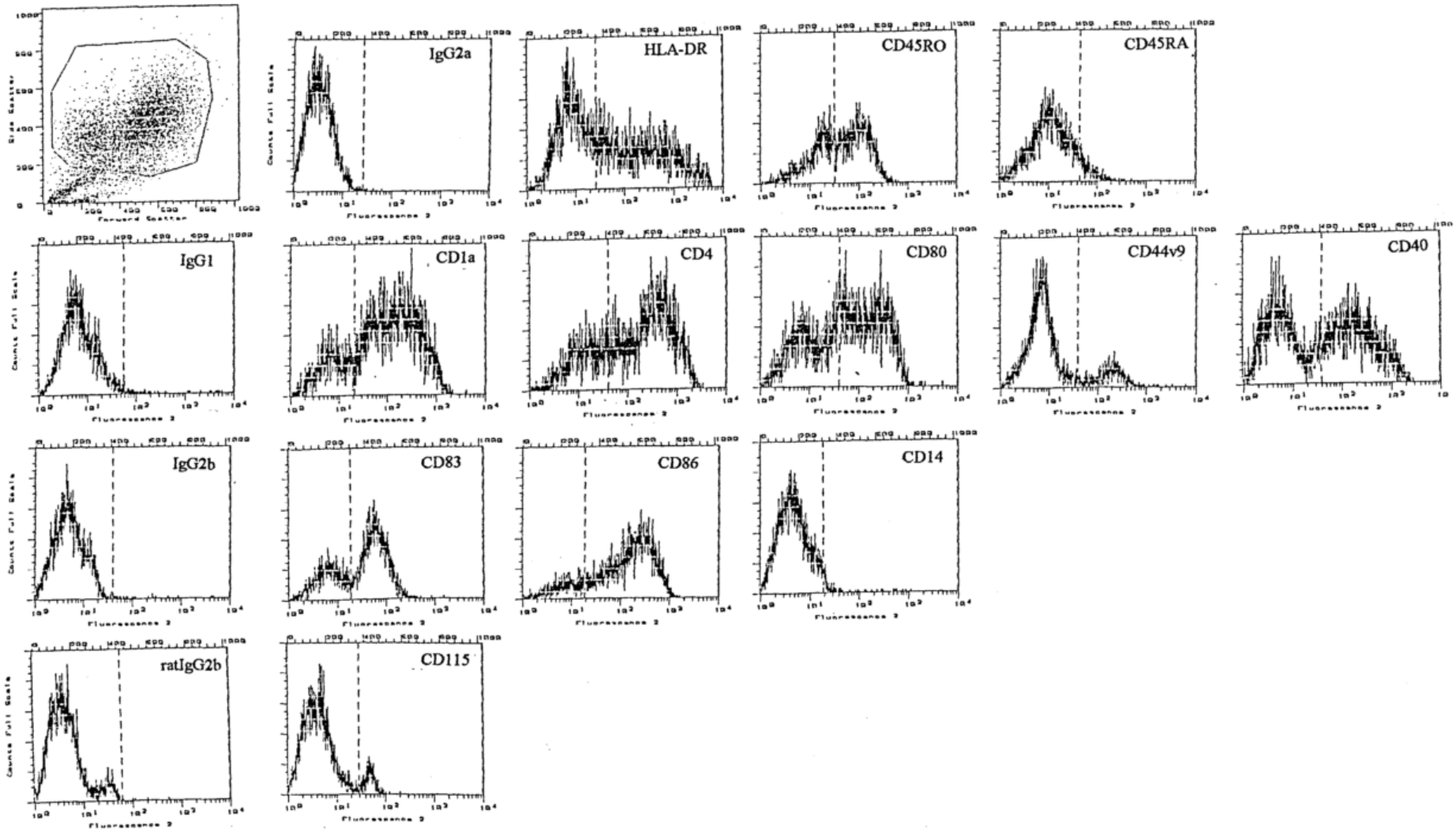


Abb.10: FACS-scan Analysen von dendritischen Zellen, die mit R10+GM-CSF+IL-4 + MCM kultiviert worden sind (reife dendritische Zellen). Die Zellen wurden mit der Adhärenzmethode gewonnen und die Abbildung ist für 10 Versuche repräsentativ. Die Histogramme der FACS-scan Analysen stellen die im FSC/SSC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

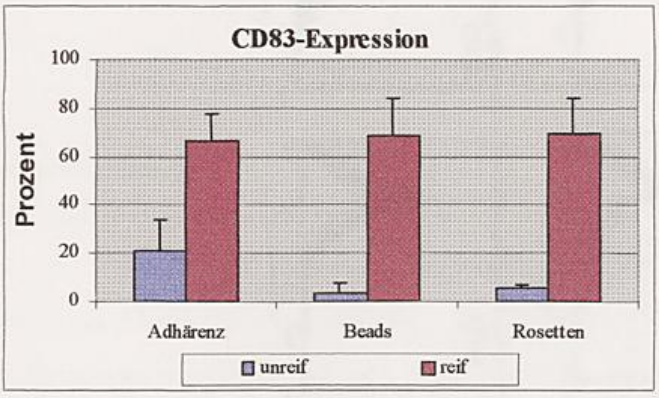


Abb.11: Vergleich der CD83 Expression bei unreifen und reifen DCs, die entweder mit der Adhärenzmethode, mit magnetischen Beads oder durch Rosettierung mit Neuraminidase-behandelten Schaferythrozyten gewonnen wurden. Die CD83 Expression wurde in Prozent der CD83 positiven Zellen dargestellt. Die Daten 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

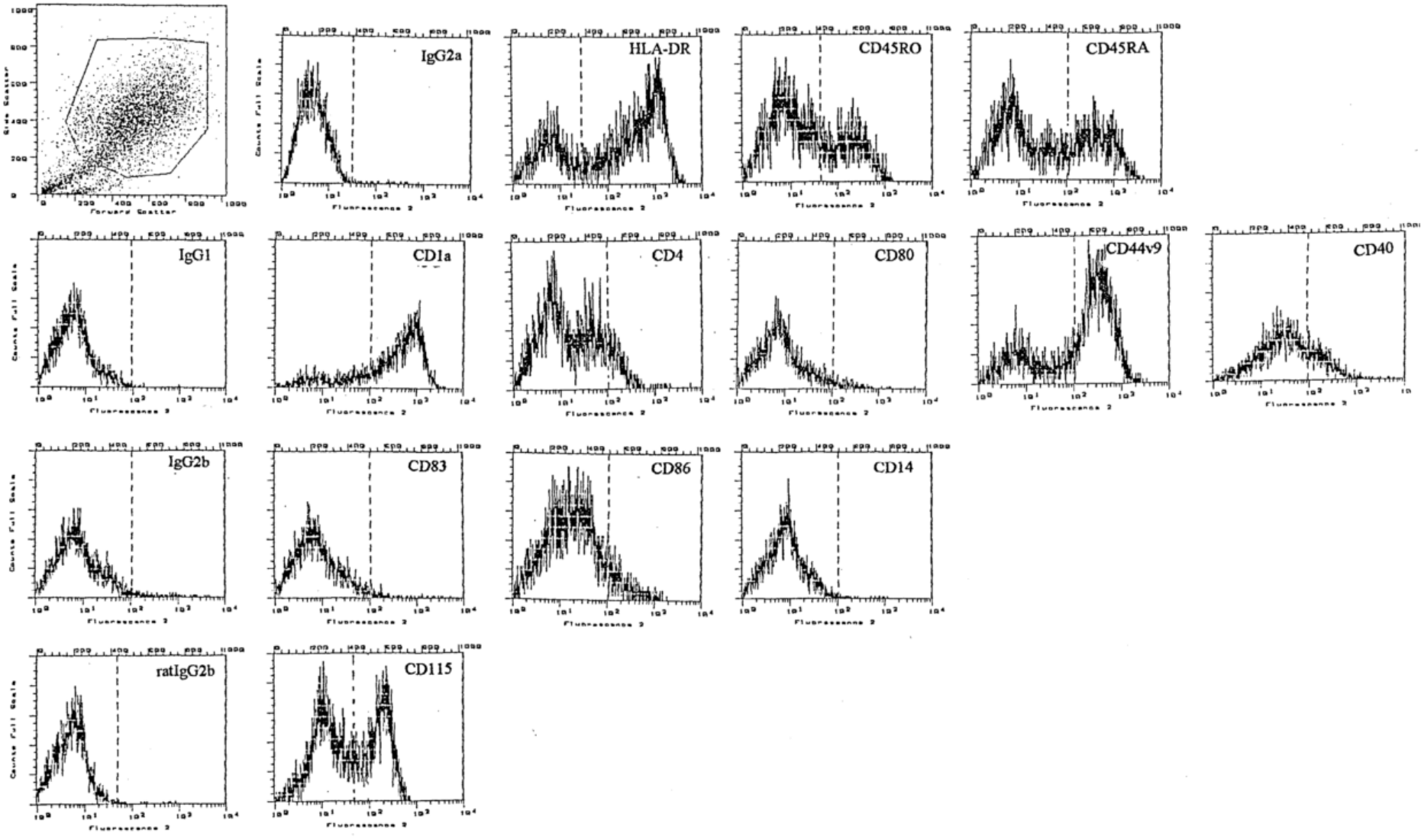


Abb.12: FACS-scan Analysen von dendritischen Zellen die in R10+GM-CSF+IL-4 gewonnen wurden (unreife dendritische Zellen). Die Zellen wurden mit der Adhärenzmethode gewonnen und die Abbildung ist für 10 Versuche repräsentativ. Die Histogramme der FACS-scan Analysen stellen die im FSC/SSC (ganz oben links)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

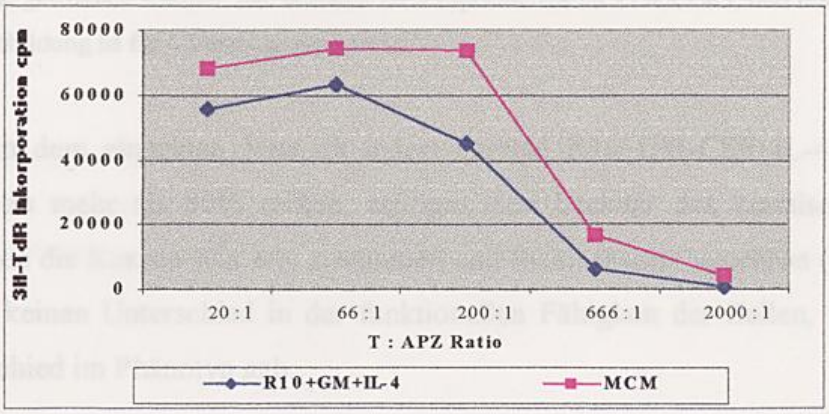


Abb.13: Immunostimulatorische Funktion von reifen (rot) und unreifen (blau) DCs, die mit der Adhärenzmethode gewonnen wurden. Diese Abbildung ist für 11 Versuche repräsentativ.

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).

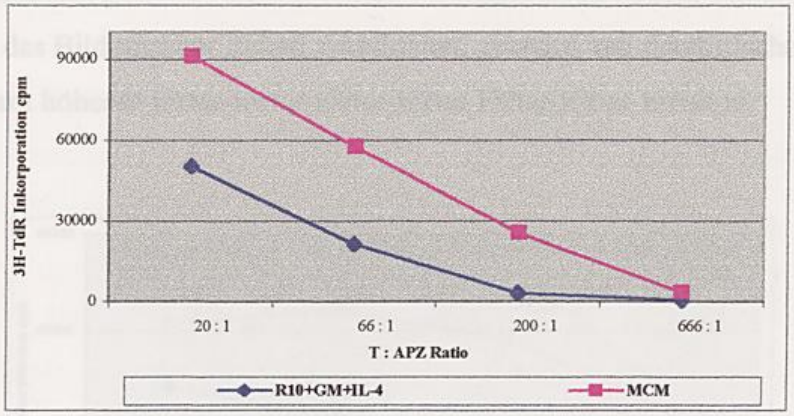


Abb.14: Immunostimulatorische Funktion von reifen (rot) und unreifen (blau) DCs, die mit der Adhärenzmethode gewonnen wurden. Die unreifen DCs exprimierten zu 27% CD83, und nur mehr zu 30% CD115. Diese Abbildung ist für 6 Versuche repräsentativ.

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.

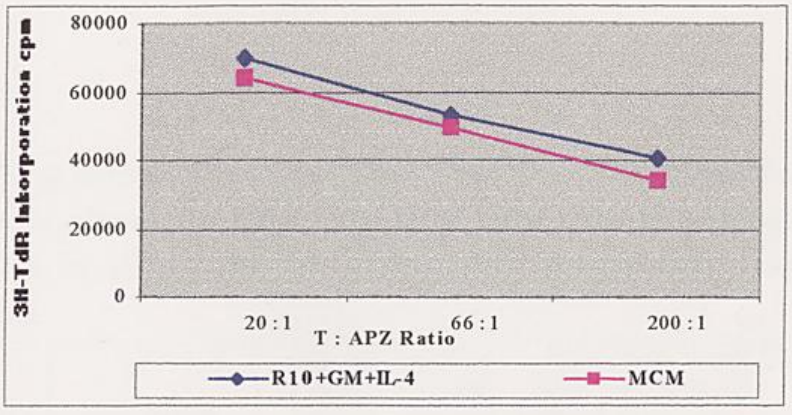


Abb.15: Immunostimulatorische Funktion von reifen (rot) und unreifen (blau) DCs, die mit der Adhärenzmethode gewonnen wurden. Diese unreifen und reifen DCs exprimierten beide zu 80% CD83; CD115 wurde nicht exprimiert.

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.

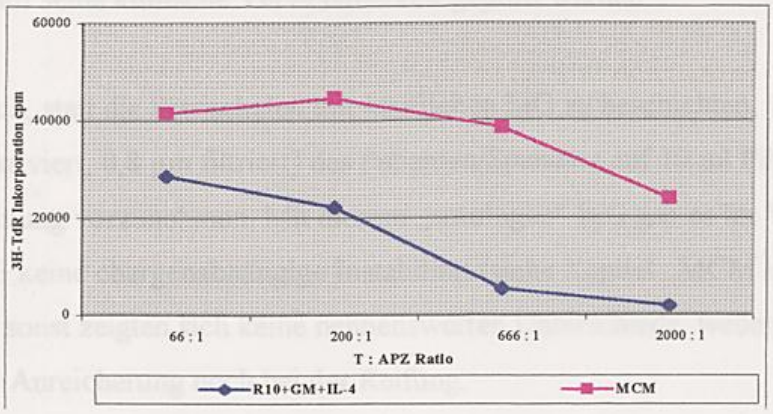


Abb.16: Immunostimulatorische Funktion von reifen und unreifen DCs , die mit der Adhärenzmethode gewonnen wurden. Die unreifen DCs exprimierten nur zu <5% CD83, und 40% CD115. Diese Abbildung ist für 3 Versuche repräsentativ.

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.

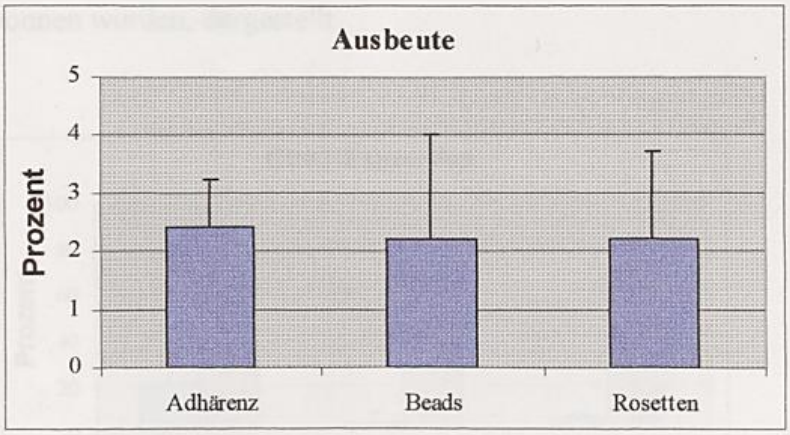


Abb.17: Mittelwerte der Ausbeute von unreifen und reifen dendritischen Zellen am d10-d12, die im FCS-freien System gewonnen wurden. Die Ausbeute wurde in Prozent dargestellt und die Standardabweichung wurde als Linie eingezeichnet. Die Prozentmengen beziehen sich auf die Zahl der Ausgangs-PBMC.

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

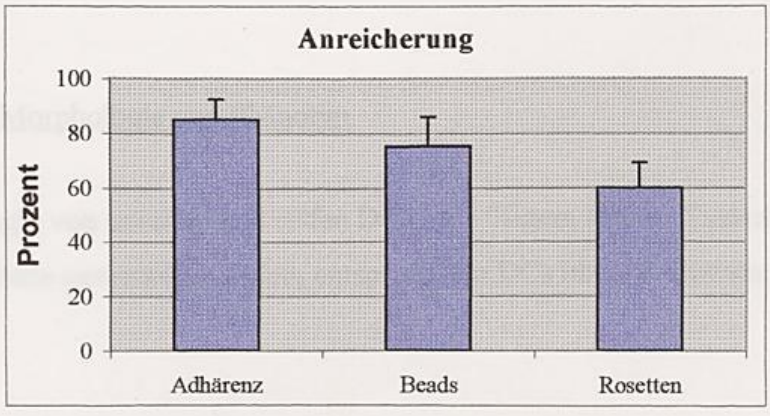


Abb.18: Mittelwerte der Anreicherung von unreifen und reifen dendritischen Zellen am d10-d12, die im FCS-freien System gewonnen wurden. Die Anreicherung wurde in Prozent dargestellt und die Standardabweichung wurde als Linie eingezeichnet.

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.

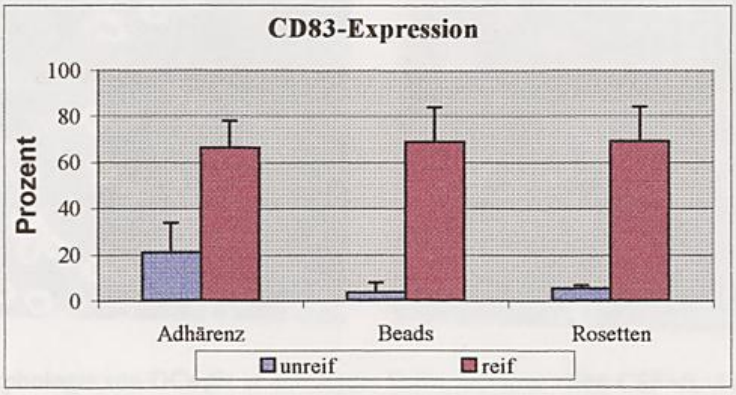


Abb.19: Vergleich der CD83 Expression bei unreifen und reifen DCs, die entweder mit der Adhärenzmethode, mit magnetischen Beads oder Neuraminidase-behandelten Schaferythrozyten im FCS-freien System gewonnen wurden. Die CD83 Expression wurde in Prozent dargestellt. Die Daten wurden mit Hilfe von FACS-scan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

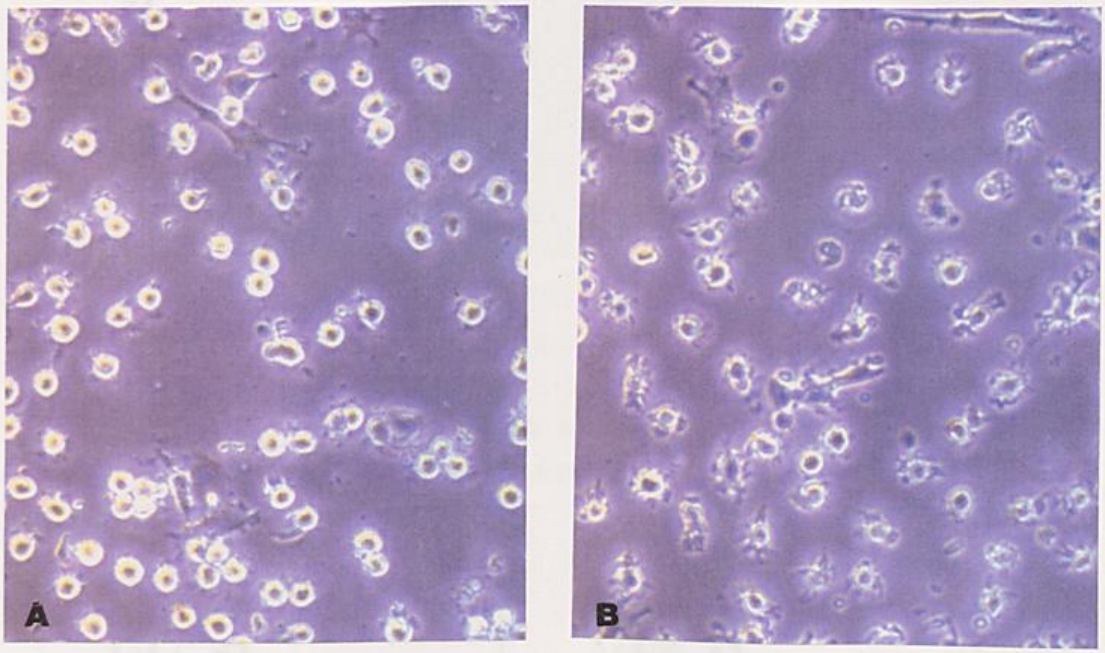


Abb.20: (A) Morphologie von DCs die in autologem Kulturmedium +GM-CSF+IL-4 mit der Adhärenzmethode kultiviert wurden = unreife DCs. (B) Morphologie von DCs in autologem Kulturmedium, die von d7 bis d10 MCM als Reifungsstimulus erhielten = reife DCs.

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.

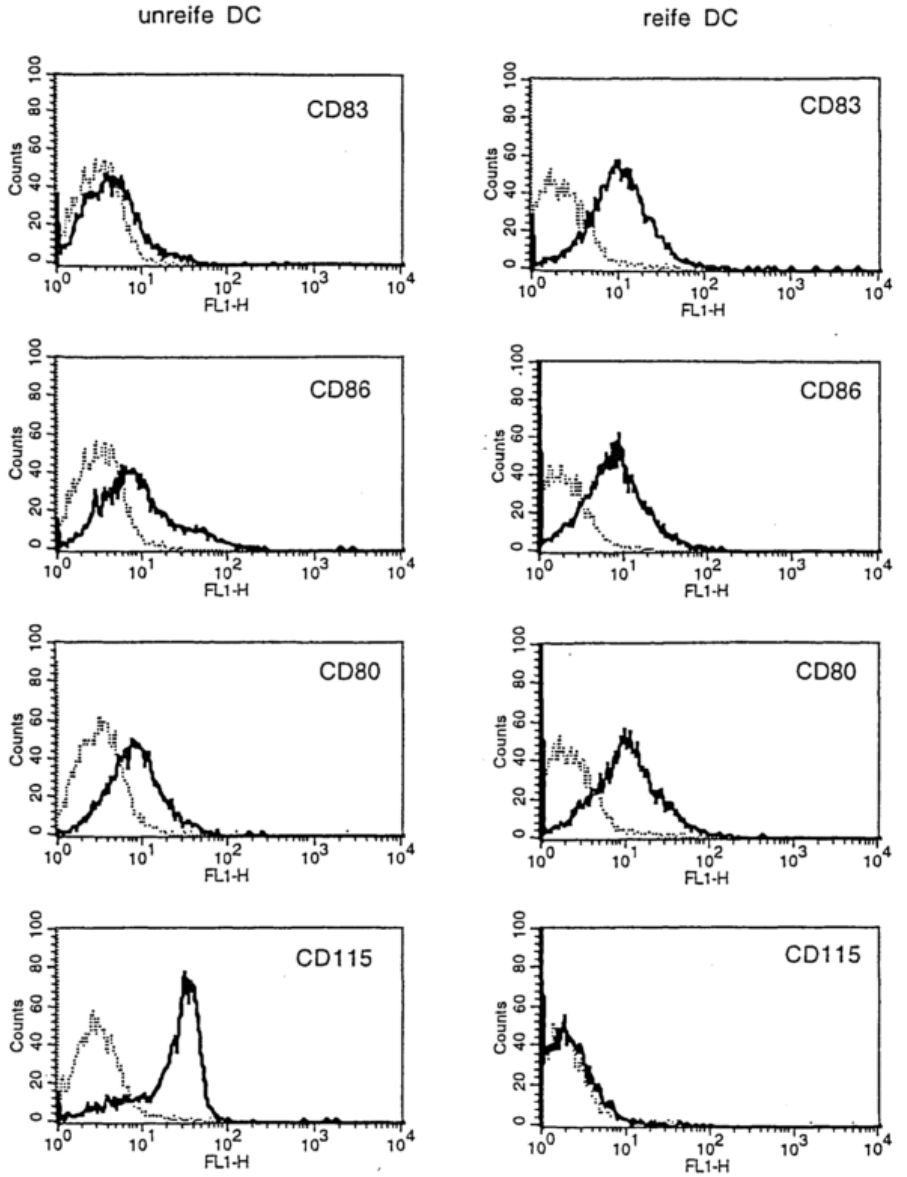


Abb.21: FACS-scan Analysen von dendritischen Zellen die mit autologem Kulturmedium+GM-CSF+IL-4 (unreife DCs) und mit autologem Kulturmedium+GM-CSF+IL-4 + **MCM** (reife DCs) kultiviert worden sind. Die Zellen wurden mit der Adhärenzmethode gewonnen. Die Histogramme der FACS-scan Analysen stellen im FSC/SSC 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).

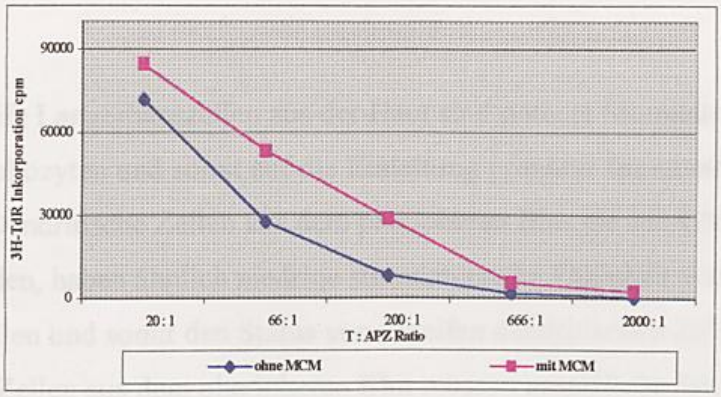


Abb.22: Immunostimulatorische Funktion von reifen (rot) und unreifen (blau) DCs, die mit der Adhärenzmethode gewonnen wurden. Diese Abbildung ist für 3 Versuche repräsentativ.

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

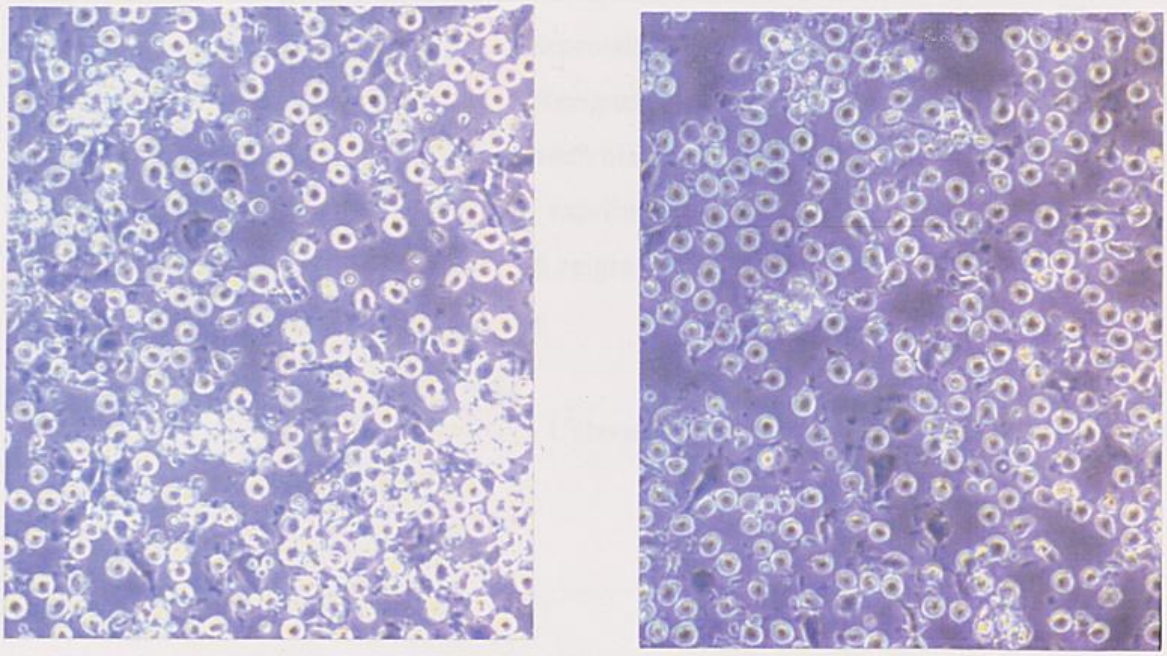


Abb.23: Dendritische Zellen die in GM-CSF + IL-4 kultiviert wurden am d7 (links), dendritische Zellen die in GM-CSF + IL-13 kultiviert wurden am d7 (rechts).

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).

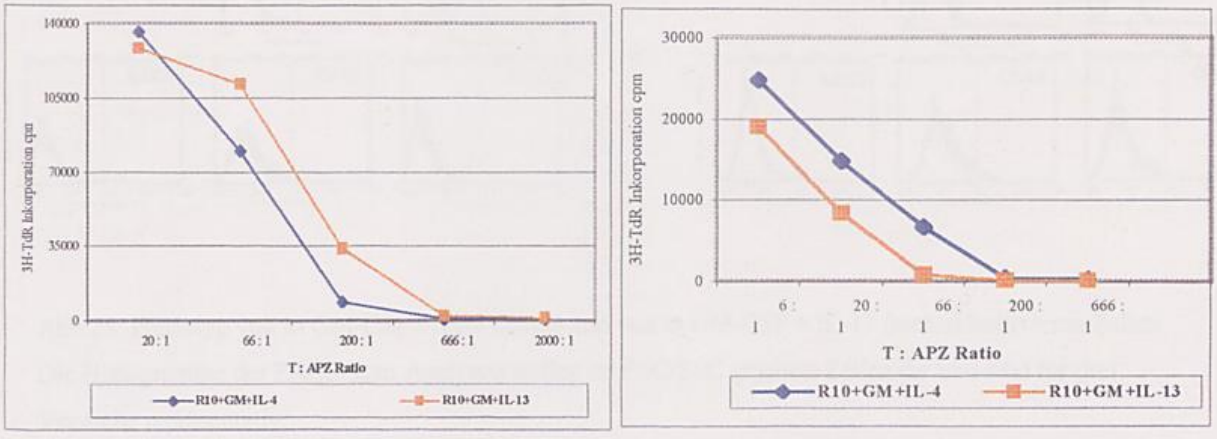


Abb.24: Immunostimulatorische Funktion von unreifen dendritischen Zellen die mit GM-CSF + IL-4 oder GM-CSF + IL-13 kultiviert wurden. In der Abbildung links wurden allogene T-Zellen verwendet, in der Abbildung rechts T-Zellen aus der Nabelschnur.

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.

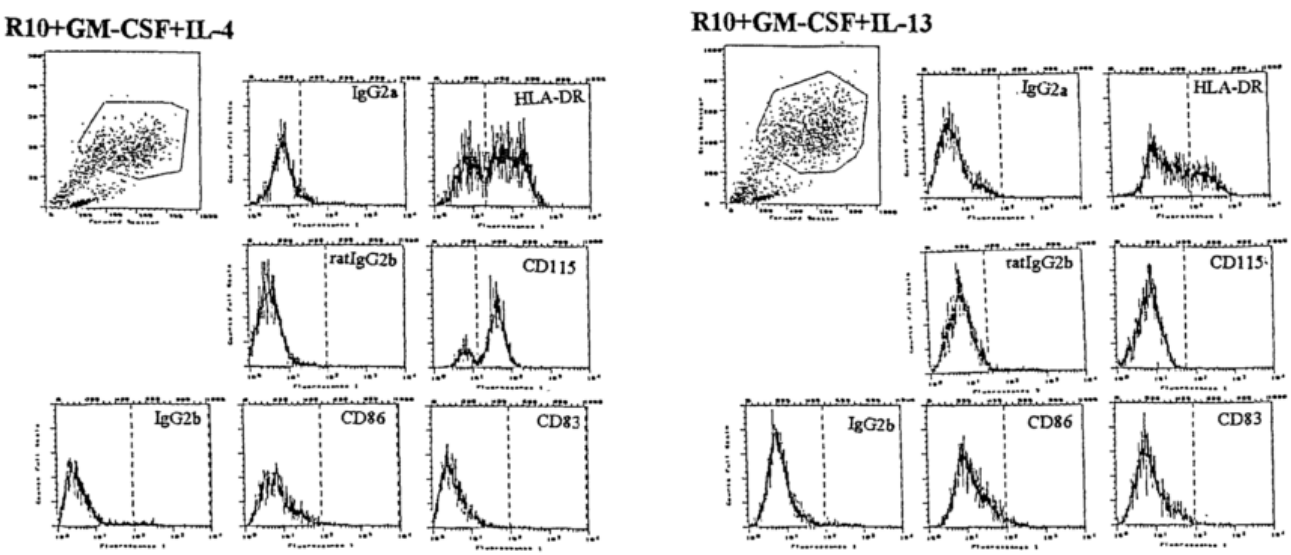


Abb.25: Phänotyp von in GM-CSF + IL-4 (links) und von in GM-CSF + IL-13 (rechts) kultivierten Zellen. Die Histogramme der FACS-scan Analysen stellen im FSC/SSC gegatete Zellen dar und sind für drei Versuche repräsentativ.

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

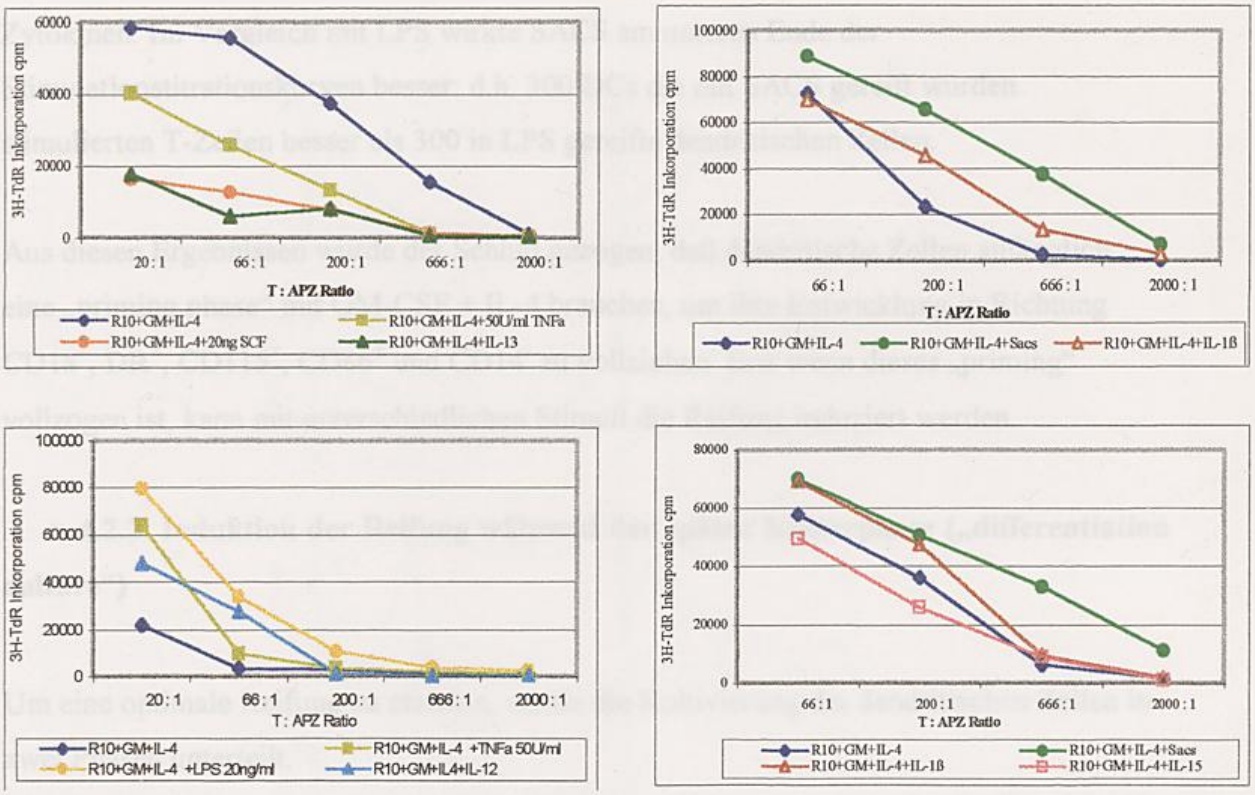


Abb.26: Immunostimulatorische Funktion von dendritischen Zellen, die mit unterschiedlichen Zytokinen kultiviert wurden. TNF-α und Stammzellfaktor (SCF) wurden einmalig am d0 zugegeben. IL-1β, IL-12, IL-13, IL-15 wurden am d0, d2, d6 und d8 zugegeben. LPS und SACS wurden einmalig am d7 zugegeben. Diese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

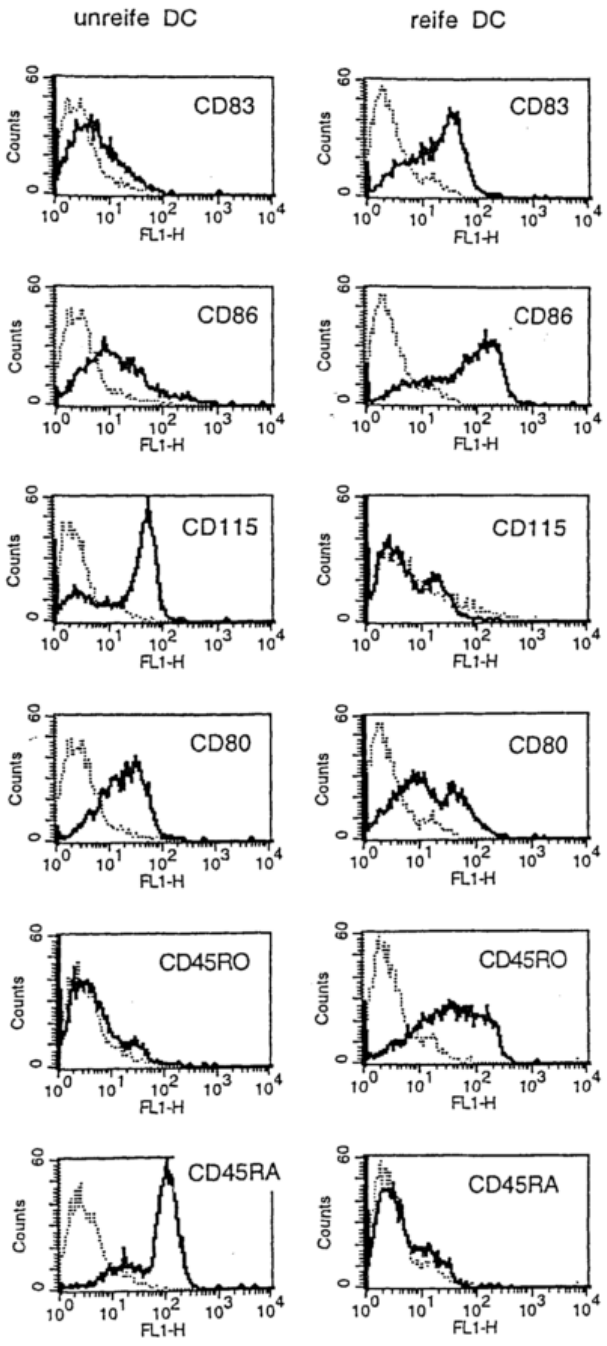


Abb.27: FACS-scan Analysen von unreifen (links) und in MCM gereiften (rechts) dendritischen Zellen. Die Abbildung ist für 16 Versuche repräsentativ. Die Histogramme der FACS-scan Analysen stellen im FSC/SSC gegatete Zellen dar (analog Abb.12 oder 25). In jedem Histogramm sind die mAb (fette Linie) und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

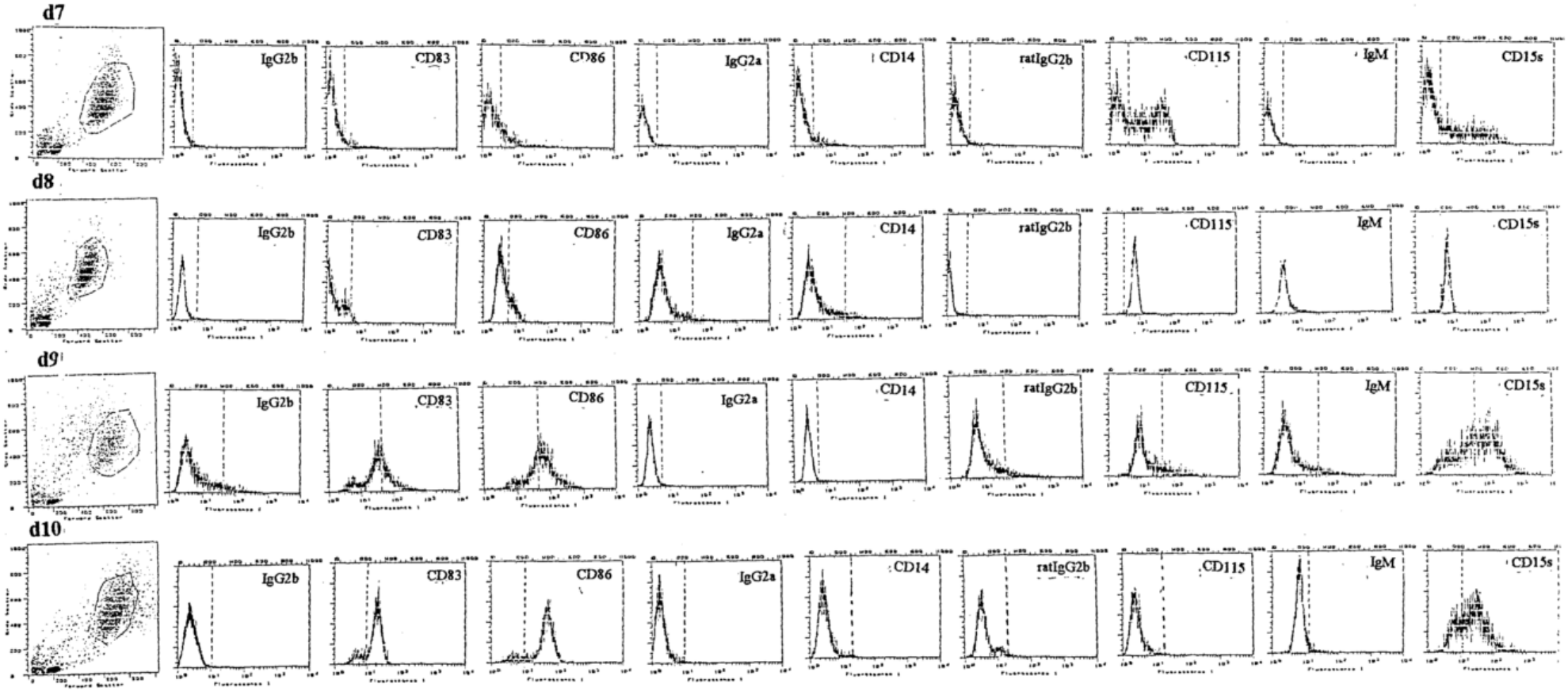


Abb.28; Zeitserie der „differentiation culture" von d7 bis d10. Die Abbildung ist für 4 Versuche repräsentativ. Die Histogramme der FACS-scan Analysen stellen im FSC/SSC gegatete Zellen dar.

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).

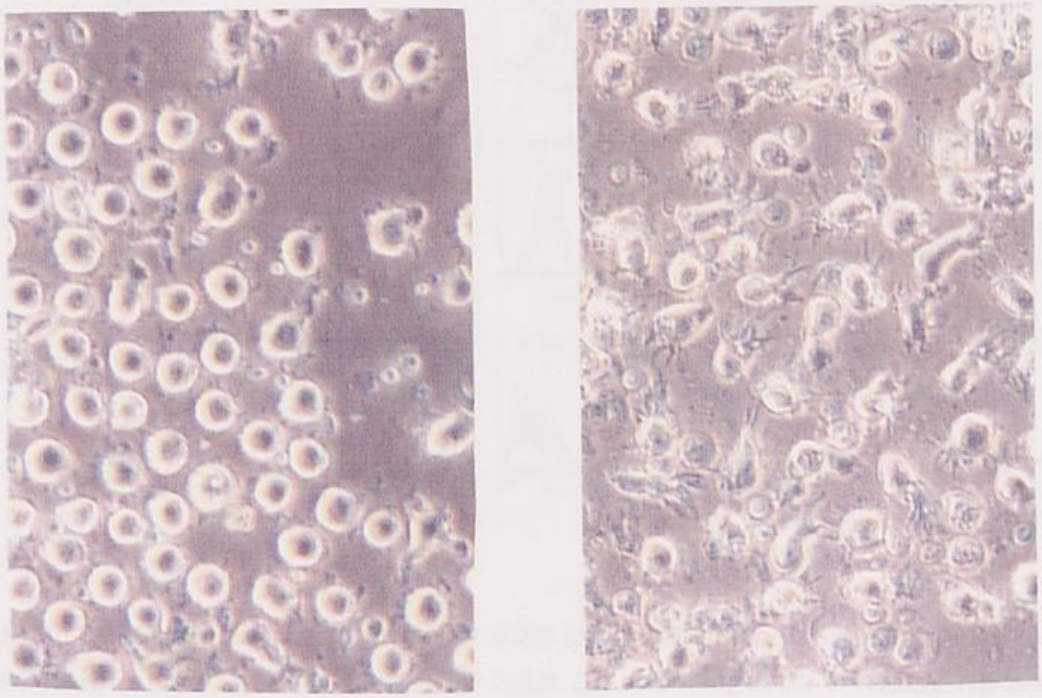


Abb.29: Morphologie von unreifen dendritischen Zellen, die in GM-CSF + IL-4 kultiviert wurden (links). Morphologie von reifen dendritischen Zellen, die von d0 – d9 in GM-CSF + IL-4 und drei weitere Tage mit SACS (1:10000) kultiviert wurden.

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

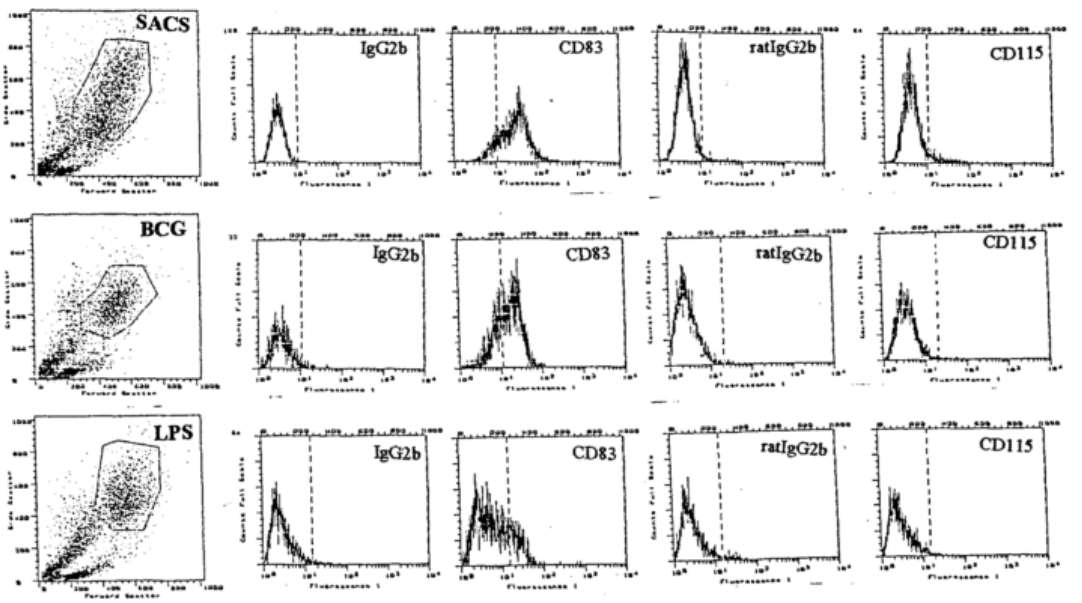
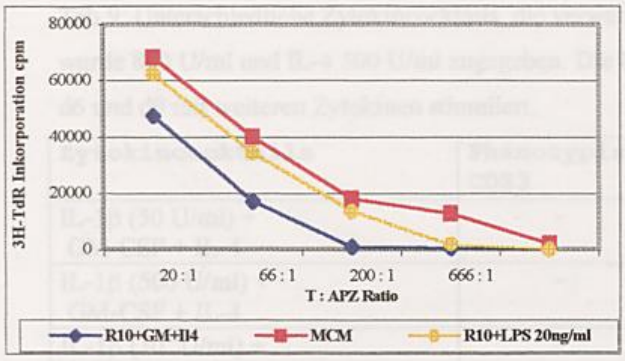


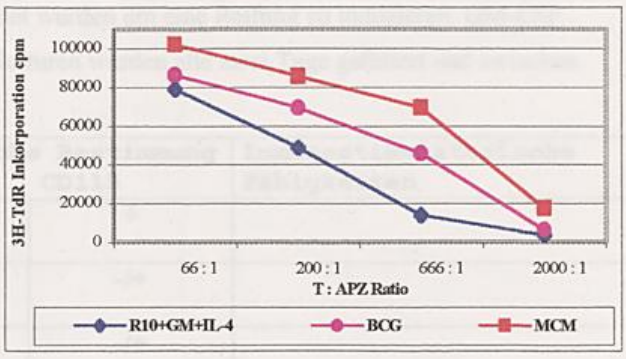
Abb.30: FACS-scan Analysen von in SACS 1:10000 (oben), BCG 6,25 x 10^7 Organismen/Well (Mitte) und LPS 20 ng/ml (unten) gereiften dendritischen Zellen. Die Abbildung ist für 4 Versuche repräsentativ. Die Histogramme der FACS-scan Analysen stellen im FSC/SSC gegatete Zellen dar.

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).





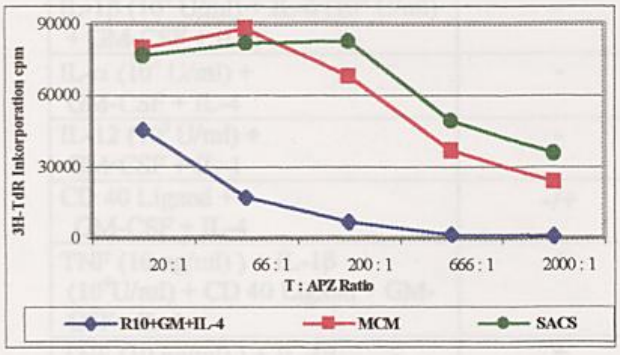


Abb.31: Immunostimulatorische Funktion von dendritischen Zellen die am d7 mit LPS, SACS und BCG stimuliert wurden im Vergleich mit in R10+GM-CSF+IL-4 und MCM. Die Messung erfolgte am d10 und ist für 3 Versuche repräsentativ.

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.

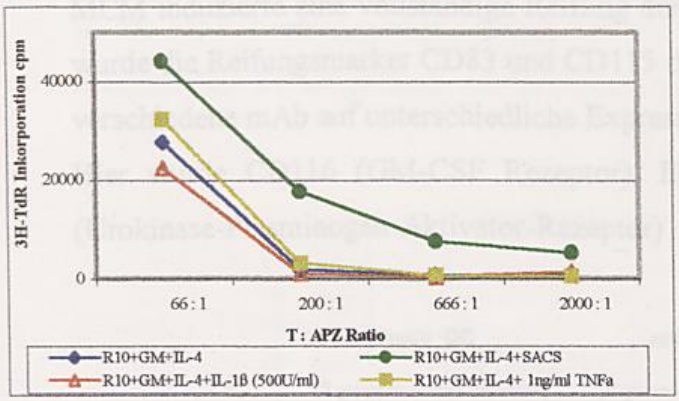
Die Kulturen wurden während der ersten 6 bis 9 Tage mit GM-CSF + IL-4 stimuliert und anschließend folgte eine dreitägige Differenzierungsphase mit dem jeweiligen Zytokin oder Zytokincocktail.

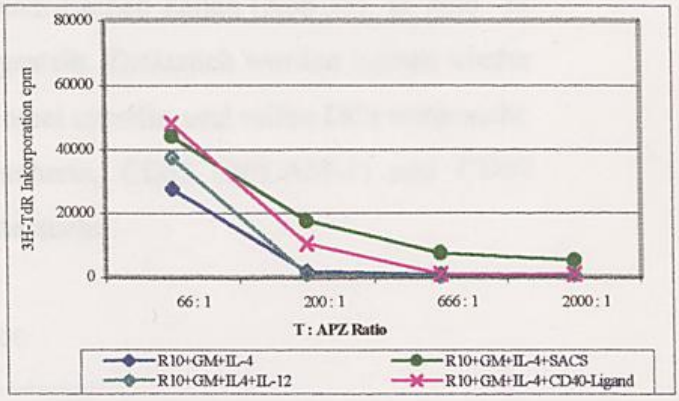
Tab.9: Unterschiedliche Zytokincocktails, die verwendet wurden um eine Reifung zu induzieren. GM-CSF wurde 800 U/ml und IL-4 500 U/ml zugegeben. Die Kulturen wurden alle zwei Tage gefüttert und zwischen d6 und d9 mit weiteren Zytokinen stimuliert.

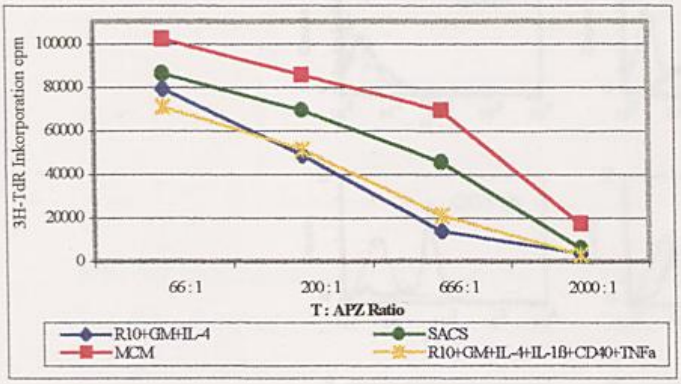
Zytokincocktails	Phänotypische Bestimmung CD83	CD115	Immunostimulatorische Fähigkeiten
IL-1β (50 U/ml) + GM-CSF + IL-4	-	+	
IL-1β (500 U/ml) + GM-CSF + IL-4	-	-/+	
IL-1β (10^4 U/ml) + GM-CSF + IL-4	-	-/+	
IL-1β (10^4 U/ml) + IL-6 (10^4 U/ml) + GM-CSF + IL-4	-	-/+	
IL-α (10^4 U/ml) + GM-CSF + IL-4	-	+	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	+	-	

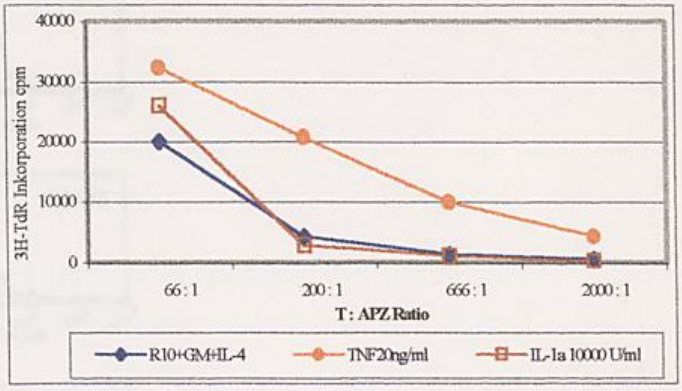
Aus Tab.9 ersieht man, daß mit allen Zytokincocktails, denen TNF (≥ 10 ng/ml) beigemengt wurde die Reifung der dendritischen Zellen induzieren werden konnte. Jedoch bereits TNF-α (10 ng/ml) allein induzierte eine vollständige Reifung. Mit CD40-Ligand + GM-CSF + IL-4 konnte eine teilweise Reifung induziert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









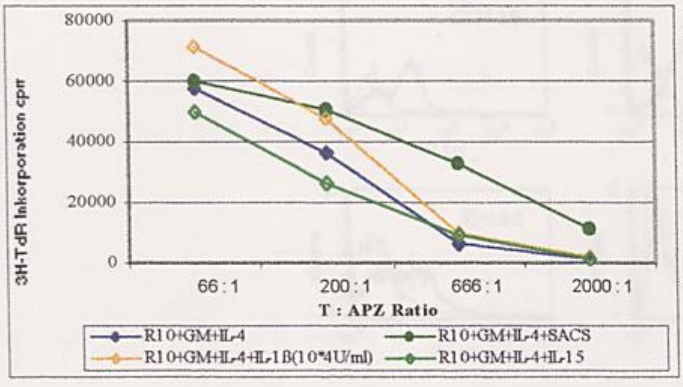


Abb.32: Immunostimulatorische Funktion von dendritischen Zellen, die am d7 mit unterschiedlichen Zytokinen oder SACS oder MCM stimuliert wurden und drei weitere Tage inkubierten (differentiation culture). Diese Abbildung ist für 4 Versuche repräsentativ.

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.

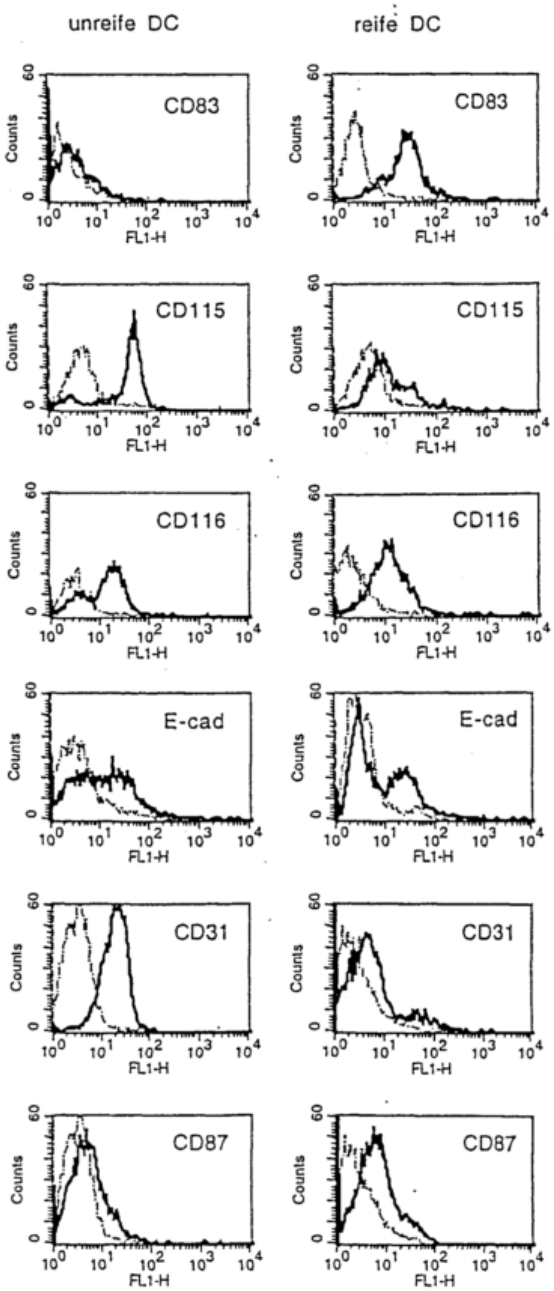


Abb.33: FACS-scan Analysen von unreifen (links) und reifen (rechts) dendritischen Zellen. Die Abbildung ist für 7 Versuche repräsentativ. Die Histogramme der FACS-scan Analysen stellen im FSC/SSC gegatete Zellen dar. In jedem Histogramm sind die mAb (fette Linie) und die dazu passenden Isotypkontrollen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

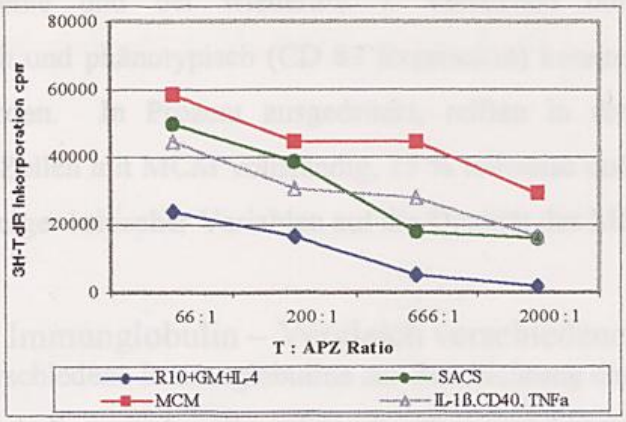


Abb. 34: Immunostimulatorische Fähigkeit von dendritischen Zellen die in GM-CSF + IL-4, MCM, SACS und dem Zytokincocktail TNF-α + IL-1β + CD40-Ligand gereift wurden. Diese Abbildung ist für 4 Versuche repräsentativ.

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

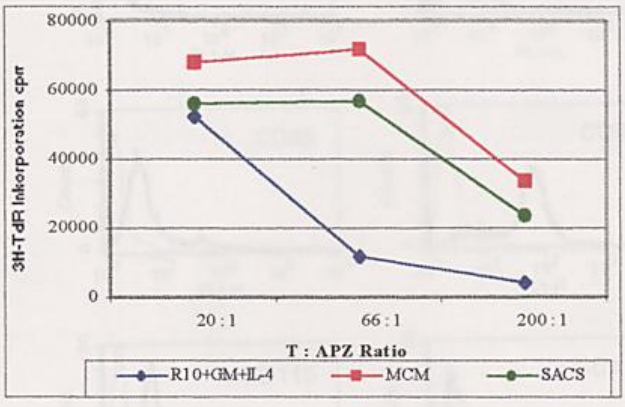


Abb.35: Immunostimulatorische Fähigkeiten von dendritischen Zellen die mit R10+GM-CSF+IL-4, MCM und SACS kultiviert wurden. Die DCs wurden mit T-Zellen aus der Nabelschnur stimuliert. Diese Abbildung ist für 3 Versuche repräsentativ.

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).

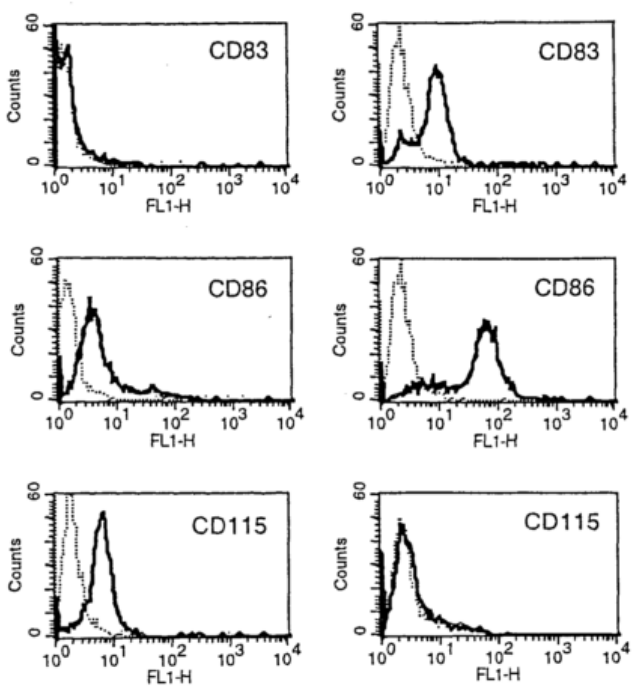
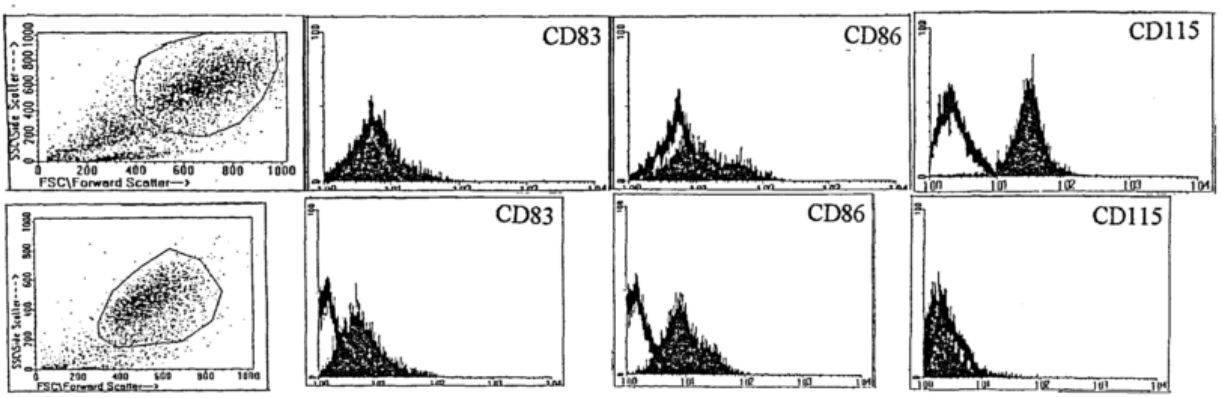


Abb.36: FACS-scan Analysen von unreifen (links) und reifen (rechts) dendritischen Zellen. Die Abbildung ist für 10 Versuche repräsentativ. Die Histogramme der FACS-scan Analysen stellen im FSC/SSC gegatete Zellen dar. In jedem Histogramm sind die mAb (fette Linie) und die dazu passenden Isotypkontrollen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

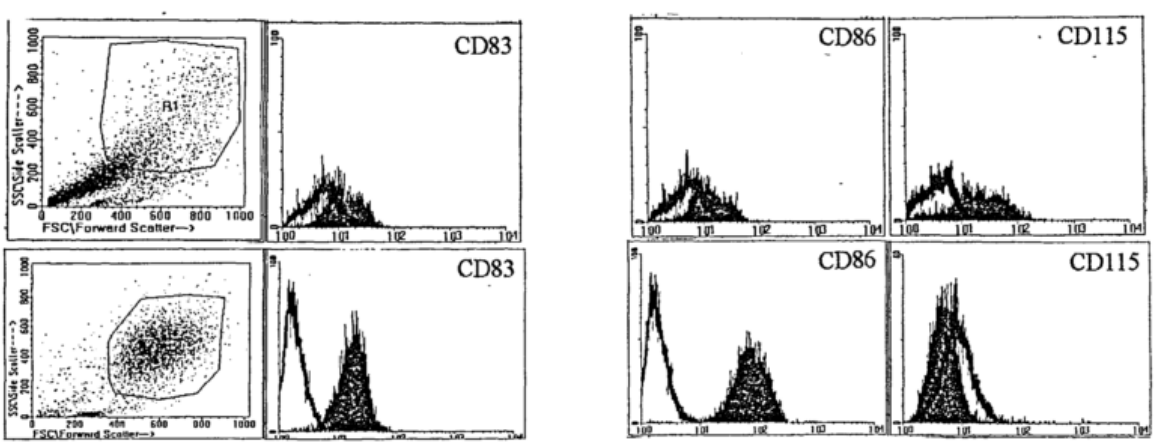


Abb.37a: : FACS-scan Analysen von dendritischen Zellen, die mit MCM stimuliert wurden, das mit Monomerem 7s-IgG (oberen 2 Reihen) und Endobulin (unteren 2 Reihen) hergestellt wurde. Die jeweilige erste Reihe stellt die CD83 und CD86 und CD115 Expression von DCs dar, die mit MCM nicht reiften. Die zweite 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.

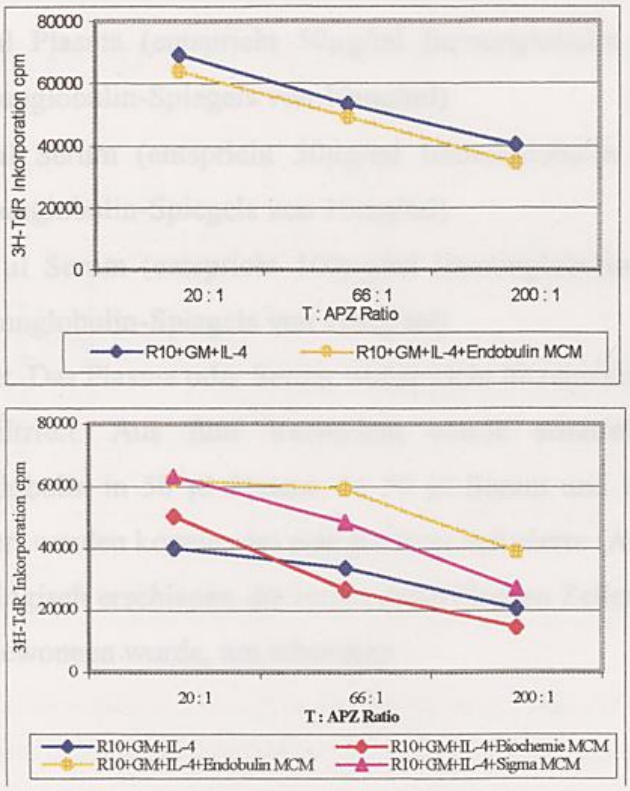


Abb.37b: Immunostimulatorische Funktion von dendritischen Zellen, die mit unterschiedlichen MCMs, zu deren Herstellung chargenunterschiedliche Immunglobuline verwendet wurden, kultiviert wurden. Diese Abbildung ist für 3 Versuche repräsentativ.

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.

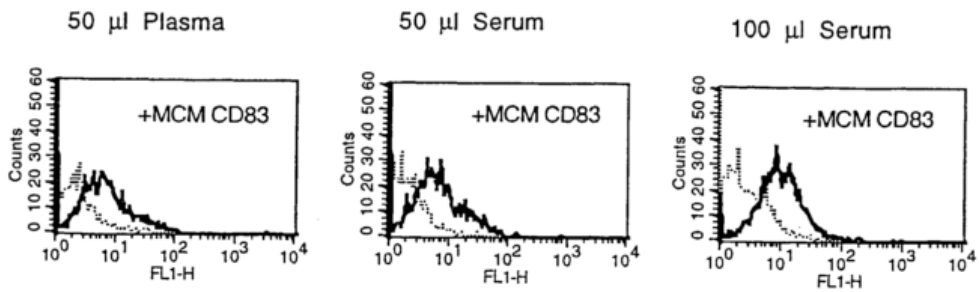


Abb.38: FACS-scan Analysen von dendritischen Zellen die mit MCM stimuliert wurden, das mit spendereigenem Immunglobulin hergestellt wurde. Die Abbildung ist für 4 Versuche repräsentativ. Die Histogramme der FACS-scan Analysen stellen im FSC/SSC gegatete Zellen dar. In jedem Histogramm sind die mAb (fette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

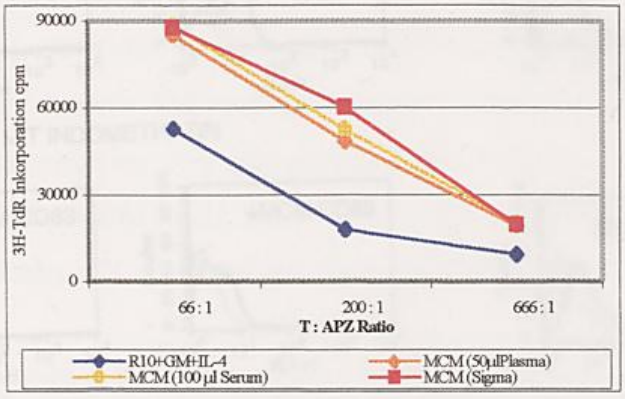


Abb.39: Immunostimulatorische Fähigkeiten von dendritischen Zellen die mit MCM stimuliert wurden, das mit spendereigenem Immunglobulin hergestellt wurde. Diese Abbildung ist für 2 Versuche repräsentativ.

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.

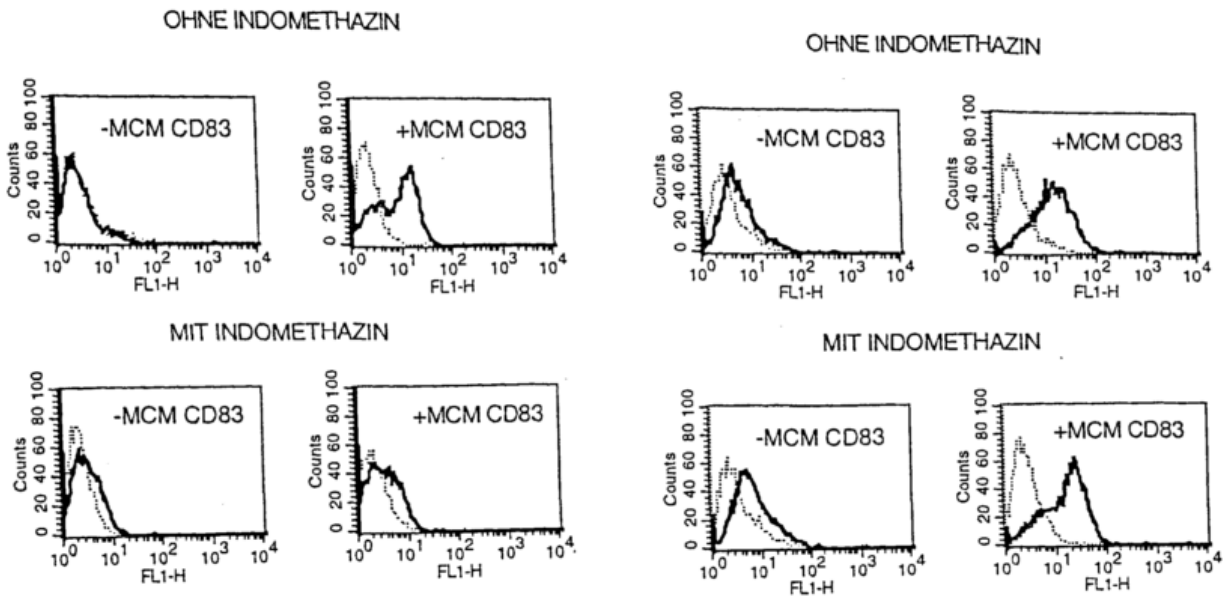


Abb.40: In dieser Abbildung sind 2 Versuche abgebildet (linkes Viererpanel, rechtes Viererpanel). Beim linken Viererpanel hemmte Indomethazin die CD83 Expression. Im rechten Viererpanel konnte kein Einfluß des Indomethazins auf die CD83 Expression festgestellt werden.

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).

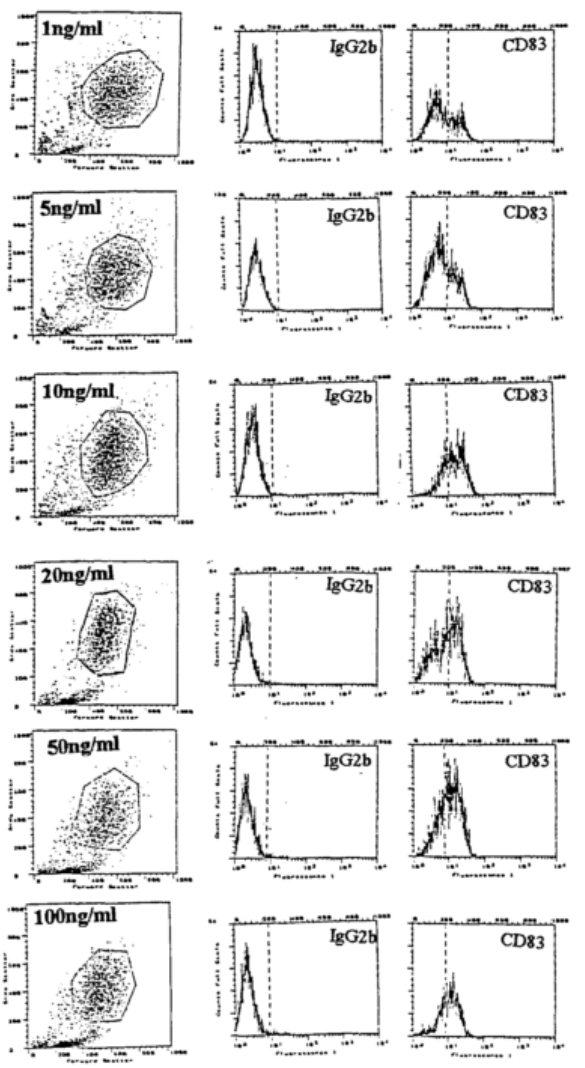


Abb.41: TNF-Konzentrationsreihe. Diese Abbildung ist für 3 Versuche repräsentativ.

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).

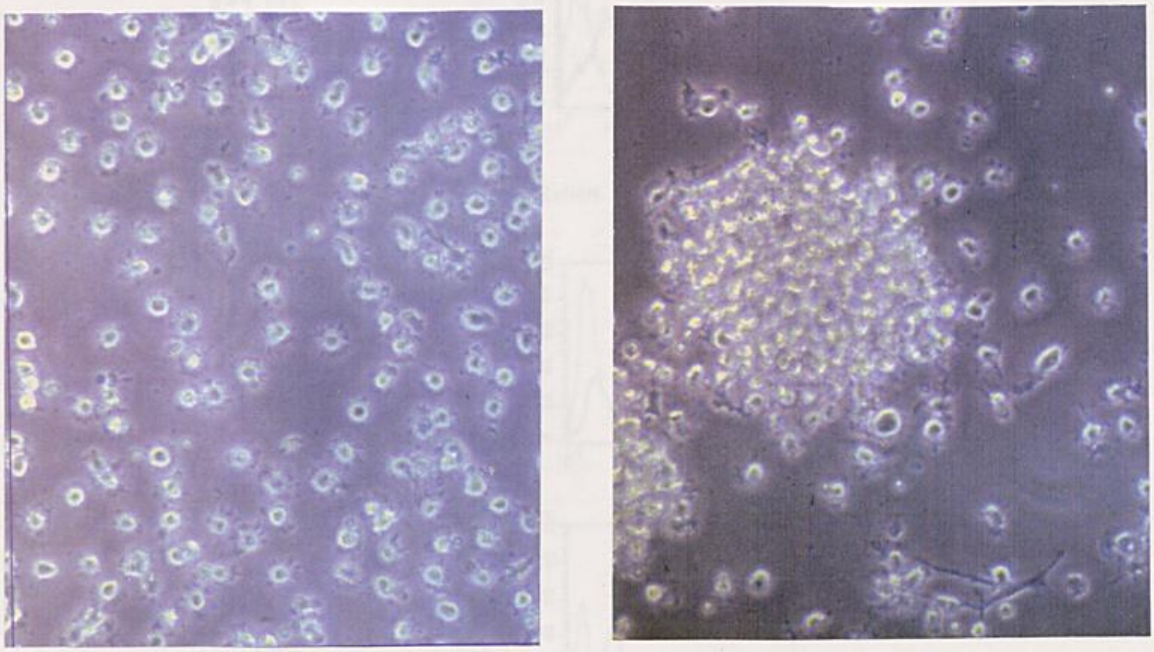


Abb.42: Differentiation culture von in MCM gereiften (links) und in 20 ng/ml TNF (rechts) gereiften dendritischen Zellen am d10.

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).

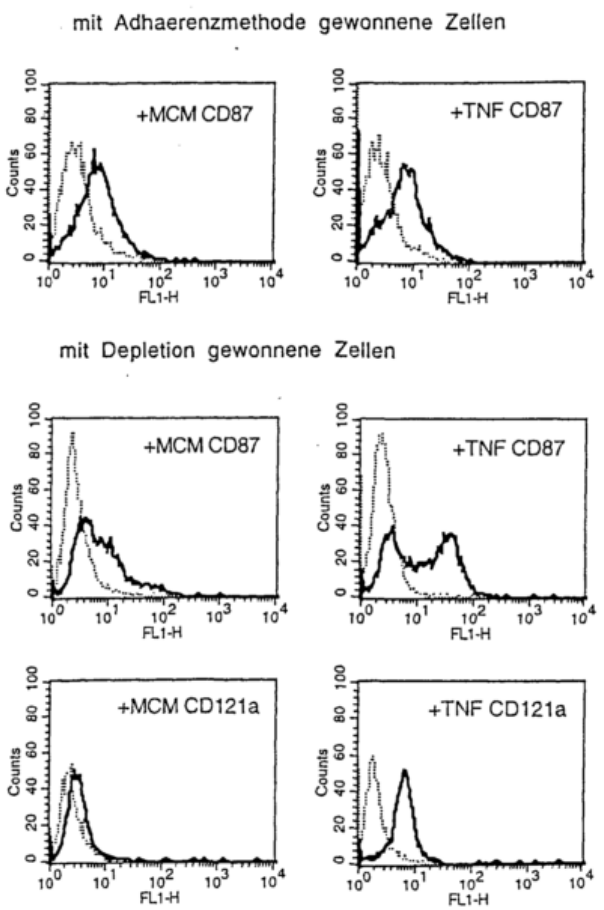


Abb.43: CD87 und CD121a Expression von dendritischen Zellen die in MCM und TNF gereift wurden.

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).

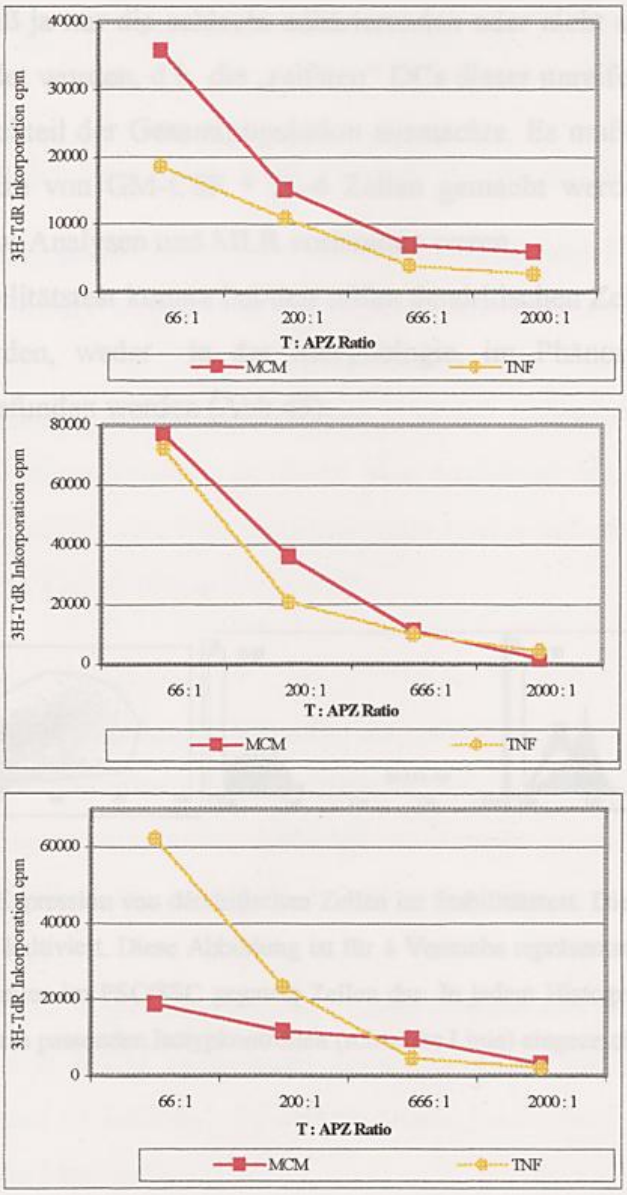


Abb.44: Immunostimulatorische Funktion von dendritischen Zellen die in MCM und TNF gereift wurden.

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).

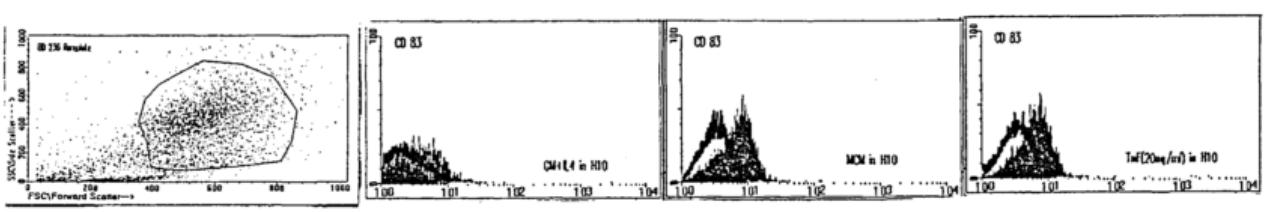


Abb.45a: CD83 Expression von dendritischen Zellen im Stabilitätstest. Die Zellen wurden 48 Stunden ohne Zytokine in H10 kultiviert. Diese Abbildung ist für 4 Versuche repräsentativ. Die Histogramme der FACS-scan Analysen stellen im FSC/SSC gegatete Zellen dar. In jedem Histogramm sind die mAb (volle,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

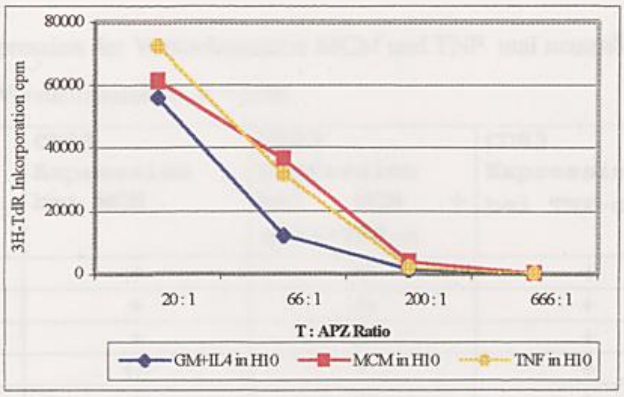


Abb.45b: Immunostimulatorische Funktion von dendritischen Zellen nach 48 Stunden in H10 (Stabilitätstest). Diese Abbildung ist für 2 Versuche repräsentativ.

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.

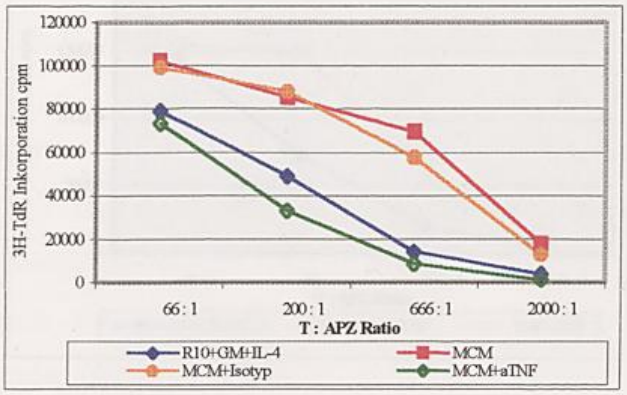


Abb.46: Immunostimulatorische Funktion von dendritischen Zellen die mit R10+GM-CSF+ IL-4, MCM, MCM+Isotypkontrolle von neutralisierendem Antikörper gegen TNF (aTNF) und MCM+ aTNF (neutralisierender Antikörper gegen TNF) stimuliert wurden.

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.

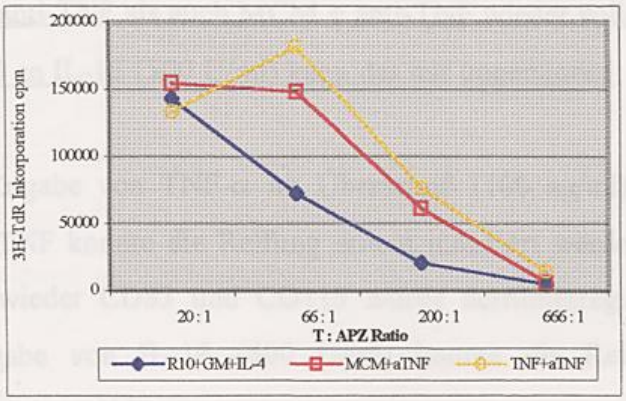


Abb.47: Immunostimulatorische Fähigkeiten von dendritischen Zellen die mit MCM + anti-TNF und TNF + anti-TNF stimuliert wurden.

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).

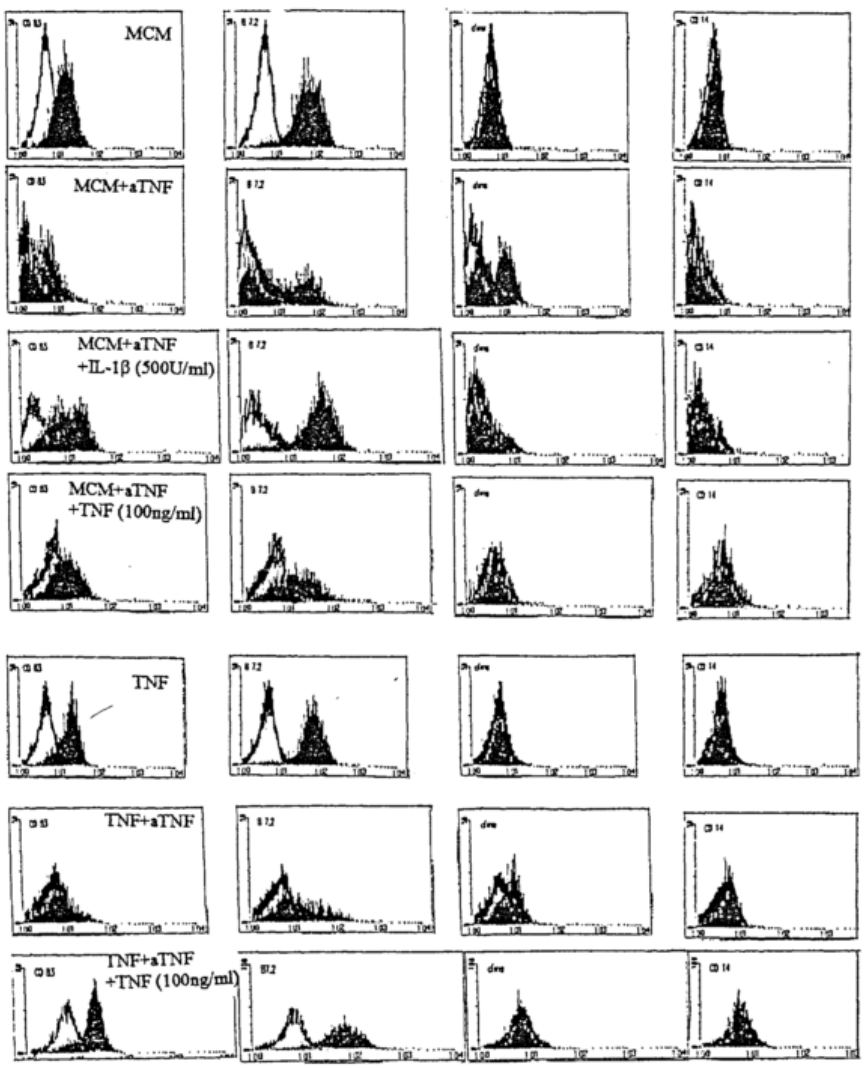


Abb.48: CD83, CD86 (B7-2), CD115 (cfms) und CD14 Expression von dendritischen Zellen. Versuch der Aufhebung der Reifungsblockade durch Überschuß an TNF-α (100 ng/ml) und IL-1β (500 U/ml). Die Versuche mit IL-1β (500 U/ml) wurden mit zwei Versuchen getestet und mit TNF-α (100 ng/ml) mit fünf Versuchen.

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).

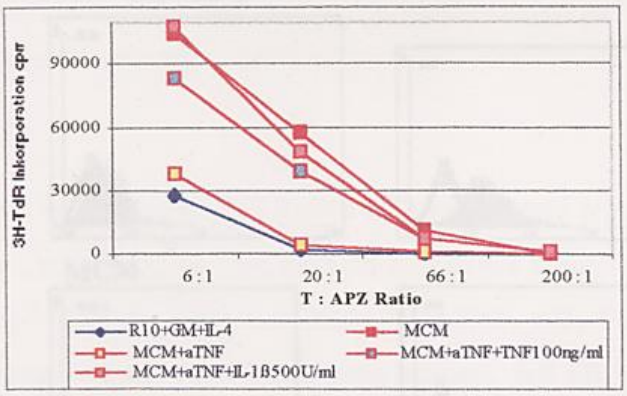


Abb.49: Immunostimulatorische Fähigkeit der dendritischen Zellen im Vergleich. Diese Abbildung stellt ein Einzelexperiment dar.

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.

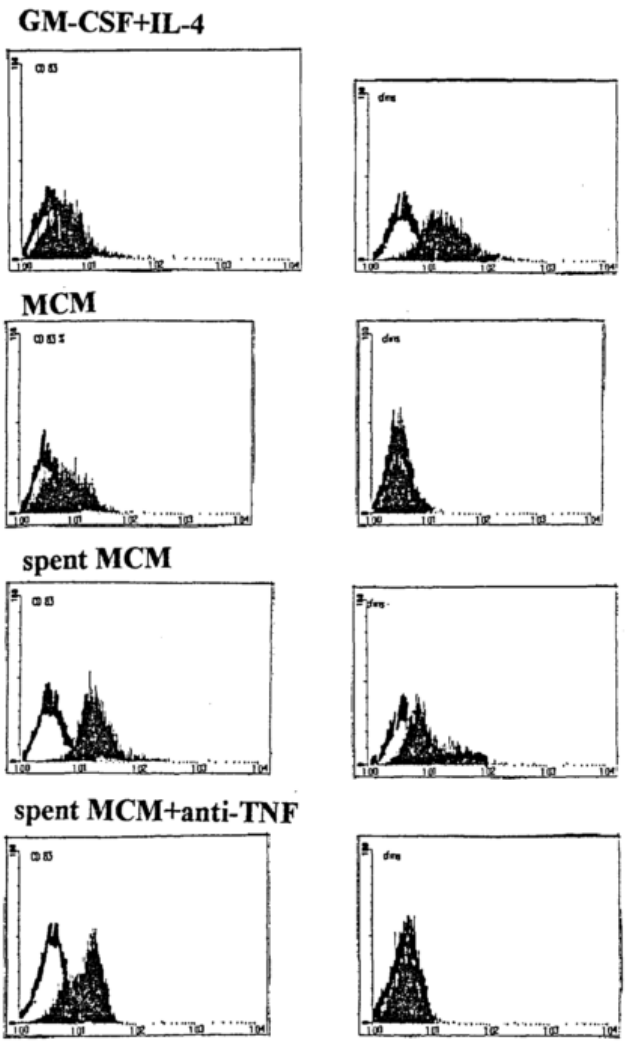


Abb.50a: CD83 und CD115 Expression von dendritischen Zellen im Versuch 238. Die Histogramme der FACS-scan Analysen stellen im FSC/SSC gegatete Zellen dar. In jedem Histogramm sind die mAb (volle, graue Peaks) und die dazu passenden Isotypkontrollen (schwarze Linie) eingezeichnet.

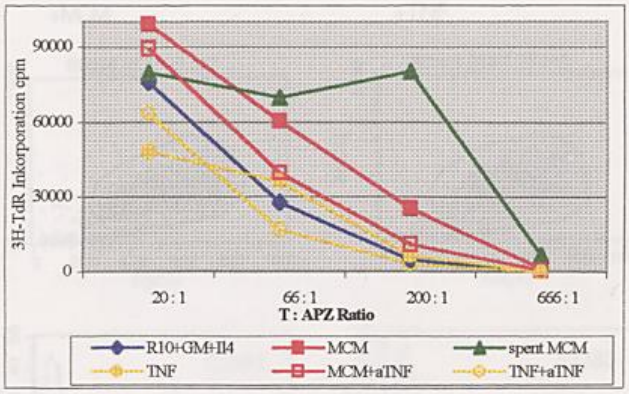


Abb.50b: Immunostimulatorische Funktion von dendritischen Zellen aus Versuch 238. Die Zellen wurden mit der Adhärenzmethode gewonnen . (spent MCM = verbrauchtes MCM)

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).

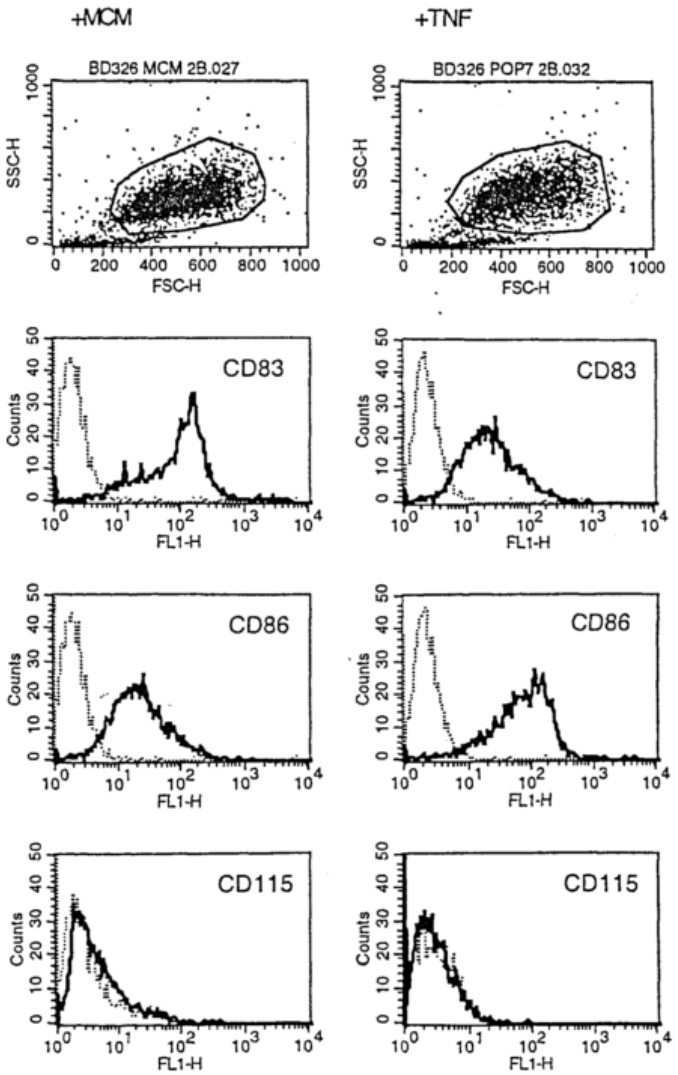
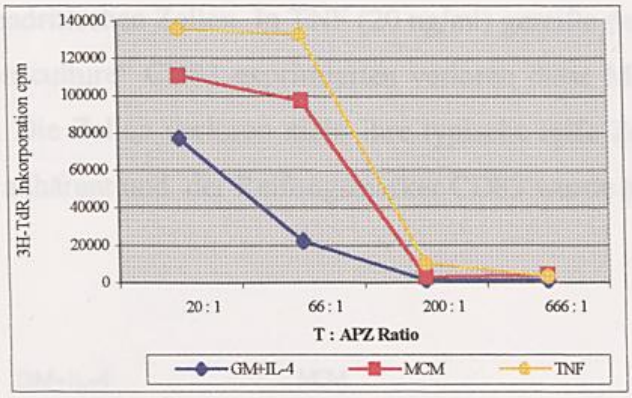
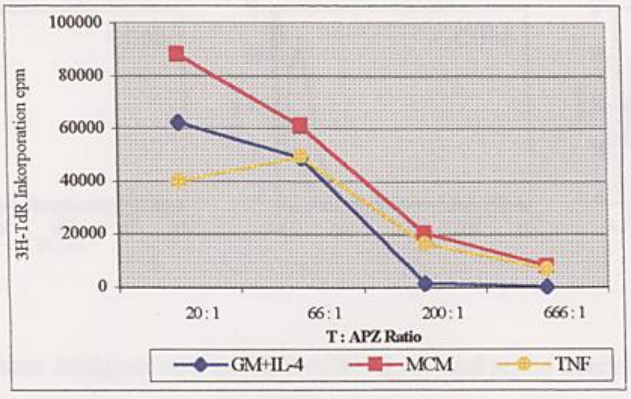


Abb.51: : FACS-scan Analysen von reifen dendritischen Zellen die im FCS-freien System mit MCM (links) und TNF (rechts) stimuliert wurden. Die Abbildung ist für 9 Versuche repräsentativ. Die Histogramme der FACS-scan Analysen stellen im FSC/SSC gegatete Zellen dar. In jedem Histogramm sind die mAb (fette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





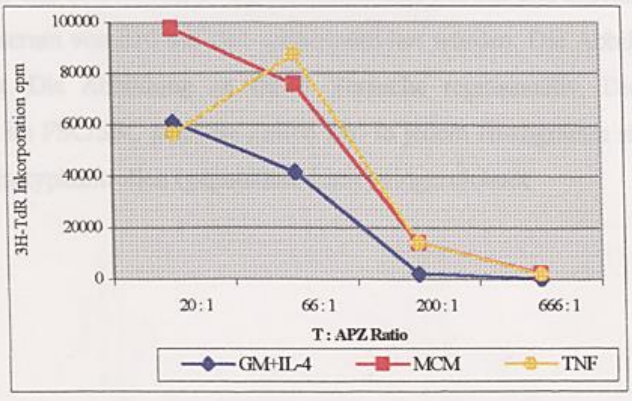


Abb.52: Immunostimulatorische Funktion von dendritischen Zellen die in R10+GM-CSF+IL-4, MCM und TNF gereift wurden. Die Abbildung zeigt 4 unterschiedliche Versuche.

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).

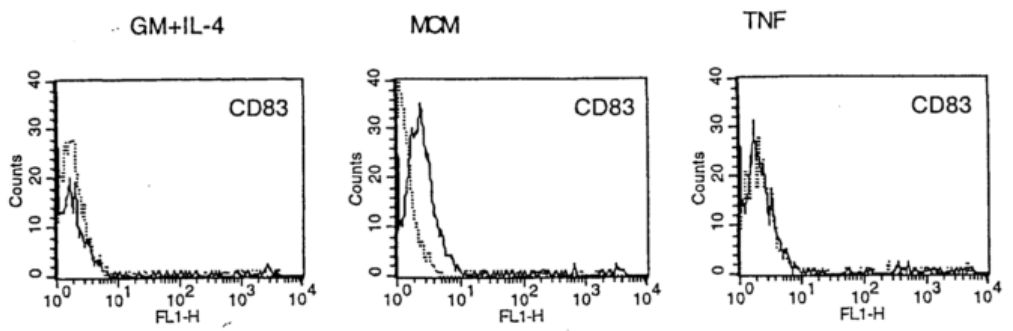


Abb.53: FACS-scan Analysen von unreifen (GM+IL-4) und reifen dendritischen Zellen, die im FCS-freien System mit MCM und TNF-α von d7 auf d10 stimuliert wurden und anschließend im zytokinfreien Medium mit 10% Humanserum von d10 auf d12 weiterkultiviert wurden. Die Abbildung zeigt die CD83 Expression im 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.

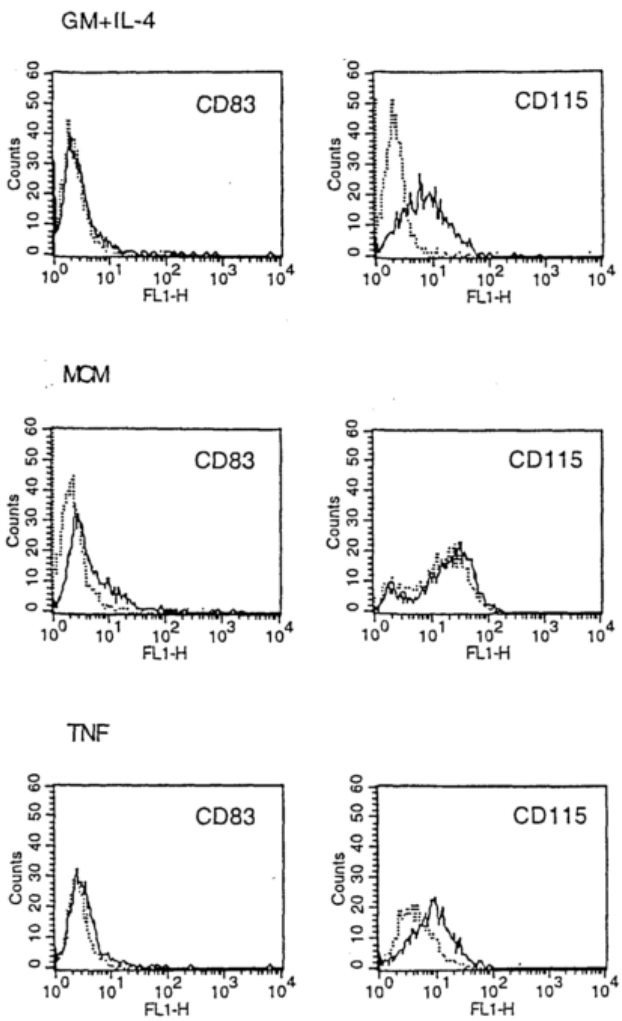


Abb.54a: FACS-scan Analysen von unreifen (GM+IL-4) und geblockten dendritischen Zellen, die im FCS-freien System mit MCM + anti-TNF und TNF + anti-TNF stimuliert wurden. Die Abbildung ist für 3 Versuche repräsentativ. Die Histogramme der FACS-scan Analysen stellen im FSC/SSC gegatete Zellen dar. In jedem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

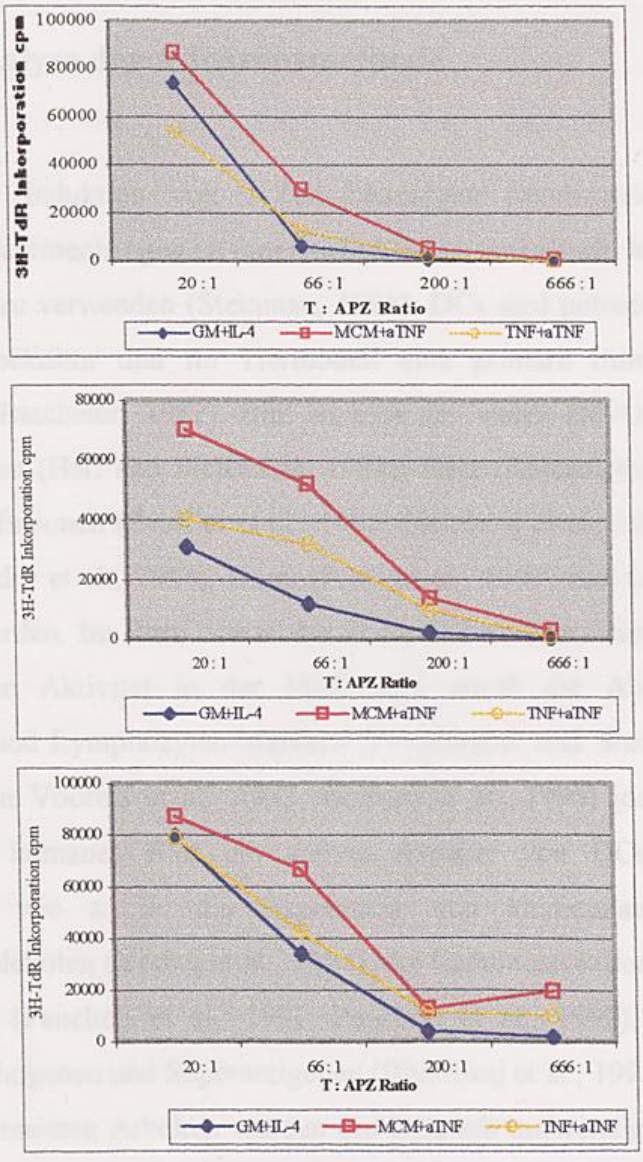


Abb.55b: Immunostimulatorischen Funktion von dendritischen Zellen im FCS-freien System. Diese Abbildung stellt drei unabhängige Experimente dar.