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

5. Diskussion

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

5. Diskussion

5.1. Analyse der Adhärenzmethode

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

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

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

5.1.1. Ausbeute und Anreicherung

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

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

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

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

5.1.2. Das Reifungs-Phänomen

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

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

5.2.1. MCM im autologen System

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

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

5.2. Entwicklung und Reifung der dendritischen Zellen

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Zugabe von unterschiedlichen Zytokinen

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

IL-13

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

IL-1β

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

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

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

IL-12

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

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

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

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

IL-15

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

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

5.2.2. Induktion der Reifung während der differentiation culture

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

5.2.2.1. Bakterielle Stimuli

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5.2.2.2. Zytokincocktails in der „differentiation culture"

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

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

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

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

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

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

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

In meiner Arbeit reichte dieses Signal nicht, um eine vollständige Reifung zu induzieren. Möglich wäre, daß das lösliche Fusionsprotein nicht dasselbe Signal wie die Bindung einer CD40 L –exprimierende Zelle auslöst, einfach weil das Epitop des CD 40 Moleküls anders besetzt ist, bzw. eine sterische Hemmung stattfindet. Eine andere wahrscheinlichere Möglichkeit wäre die folgende: Signaltransduktion erfolgt in der Regel dann, wenn Zelloberflächenmoleküle vernetzt werden („cross-linking"). Cross-linking ist immer effizienter, wenn die entsprechenden Liganden immobilisiert sind, sei es auf dem Boden der Kulturgefäße oder auf der Oberfläche von Zellen. So erscheint es nicht verwunderlich, daß die Stimulation mit Fc Fusionsprotein nur teilweise erfolgte. Tatsächlich fanden wir in Experimenten zur IL-12 Synthese, daß CD40-L-transfizierte Zellen zur Expression von CD83 führten, also Reifung induzierten (Diplomarbeit, B. Krösbacher, 1998). Eine weitere Möglichkeit wäre,

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

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

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

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

5.2.4. Kritischer Parameter: „MCM ist nicht MCM"

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

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

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

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

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

Was bewirkte diese Unterschiedlichkeit?

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

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

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

5.2.4. TNF-α als Reifungsstimulus im Vergleich mit MCM

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

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

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

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

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

5.2.5.1. Unterschiede im Phänotyp

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

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

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

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

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

5.2.5.2. Unterschiede in der MLR

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

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

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

5.2.5.3. Hemmung mit neutralisierenden Antikörpern gegen TNF-α

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5.3. Unterschiedliche Reifungsstimuli in Hinblick auf klinische Verwendbarkeit

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

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

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

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