

## **Universitäts- und Landesbibliothek Tirol**

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

**Ebner, Susanne**

**1998**

6. Zusammenfassung

[urn:nbn:at:at-ubi:2-12572](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:at:at-ubi:2-12572)

## 6. Zusammenfassung

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

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

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

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

## Summary

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

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

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