

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Generierung dendritischer Zellen *in vitro*
innerhalb von 48 Stunden:
Optimierung des Reifungsprotokolls und Induktion einer
Antigen-spezifischen Immunantwort**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Katharina Schad

aus München

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. S. Endres

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Zimmermann
Priv. Doz. Dr. J. Schirra

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. A. Eigler
Dr. med. M. Dauer

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 29.05.2008

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Das humane Immunsystem.....	1
1.1.1. Das angeborene Immunsystem.....	1
1.1.2. Das erworbene Immunsystem.....	2
1.2. Dendritische Zellen und T-Zellen.....	3
1.2.1. Die dendritischen Zellen.....	3
1.2.2. Unreife dendritische Zellen.....	4
1.2.3. Reifung dendritischer Zellen.....	5
1.2.4. Antigenpräsentation durch dendritische Zellen.....	6
1.2.5. Toleranz oder Auslösen einer Immunantwort.....	7
1.2.6. Aktivierung von T-Zellen durch dendritische Zellen.....	7
1.3. Dendritische Zellen in der Tumorummuntherapie.....	9
1.4. Generierung dendritischer Zellen <i>in vitro</i>	10
1.5. Strategien zur Verbesserung des <i>FastDC</i> -Protokolls.....	11
1.6. Fragestellung.....	12
2. Material und Methoden	14
2.1. Zellulär-Immunologische Methoden.....	14
2.1.1. Zellkultur von mononukleären Zellen des peripheren Blutes.....	14
2.1.1.1. Allgemeine Zellkulturbedingungen.....	14
2.1.1.2. Blutabnahme.....	14
2.1.1.3. Isolation von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut.....	14
2.1.1.4. Gewinnung von gereinigten Monozyten über Adhärenz-Selektion.....	15
2.1.1.5. Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten.....	16
2.1.1.5.1. Das Standard-moDC-Protokoll.....	16
2.1.1.5.2. Das <i>FastDC</i> -Protokoll.....	16
2.1.1.6. Beladung von dendritischen Zellen mit Antigen.....	17
2.1.1.7. Charakterisierung von dendritischen Zellen nach zytokinfreier Kultivierung.....	18
2.1.1.8. Bestimmung von Zellzahl und Vitalität.....	18
2.1.1.9. Isolation von T-Zellen mittels der magnetischen Zellsortierung.....	18
2.1.1.10. Kokultur von dendritischen Zellen mit autologen T-Zellen.....	20
2.1.1.11. Kultivierung der T2-Zellen.....	20
2.1.2. Durchflusszytometrie.....	21

2.1.2.1. Allgemeines Funktionsprinzip.....	21
2.1.2.2. Bestimmung der Reinheit und des Überlebens.....	23
2.1.2.3. Bestimmung der Oberflächenmarker.....	23
2.1.2.4. Analyse intrazellulärer Zytokine.....	23
2.1.2.5. Identifizierung HLA-A2 positiver Zellspender.....	24
2.1.2.6. Polymere MHC-I-Moleküle.....	24
2.1.3. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	25
2.1.4. Enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT).....	25
2.1.5. [³ H]-Thymidin Proliferationstest.....	27
2.1.6. Zellvermittelter Zytotoxizitätstest.....	28
2.2. Molekularbiologische Methoden.....	29
2.2.1. Isolation zytoplasmatischer RNA.....	29
2.2.2. Reverse Transkription.....	29
2.2.3. Polymerase-Kettenreaktion.....	30
2.2.3.1. Allgemeines Funktionsprinzip.....	30
2.2.3.2. Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis bestimmter Zytokine in den <i>FastDCs</i>	30
2.2.4. Gelelektrophorese.....	32
2.3. Reagenzien, Chemikalien und Geräte.....	32
2.3.1. Geräte.....	32
2.3.2. Chemikalien.....	33
2.3.3. Radioaktive Chemikalien.....	34
2.3.4. Reagenziensätze.....	34
2.3.5. Materialien für die Zellkultur.....	35
2.3.6. Zytokine, Wachstumsstimulatoren und Stimulanzen.....	36
2.3.7. Zellkulturmedien, Lösungen und Puffer.....	37
2.3.7.1. Zellkultur, FACS, ELISPOT, ELISA.....	37
2.3.7.2. cDNA, PCR.....	38
2.3.8. Antikörper und Streptamere MHC-I-Komplexe.....	38
2.3.9. Peptide.....	39
2.3.10. Antigen.....	40
2.3.11. Zelllinie.....	40
2.3.12. Statistische Analyse.....	40
3. Ergebnisse.....	41
3.1. Direkter Vergleich der <i>FastDCs</i> mit <i>moDCs</i>	41
3.1.1. Versuchsaufbau der dreiwöchigen Kokultur.....	41
3.1.1.1. Ausbeute und Reinheit.....	42

3.1.1.2. Das Zytokinprofil der dendritischen Zellen und der T-Zellen.....	44
3.1.1.3. Induktion Peptid-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen.....	45
3.1.1.4. Induktion einer T _H 1-gewichteten Immunantwort.....	47
3.1.1.5. Lytische Aktivität der Antigen-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen.....	50
3.2. Modifizierung des <i>FastDC</i> -Protokolls und Analyse der Zellen.....	52
3.2.1. <i>FastDCs</i> in zytokinfreier Kultur.....	52
3.2.1.1. Phänotypische Reife der unterschiedlichen <i>FastDCs</i>	52
3.2.1.2. Kapazität von IFN- α - <i>FastDCs</i> zur Induktion von T-Zell-Proliferation....	53
3.2.1.3. Optimale Ausreifung der IFN- α - <i>FastDCs</i>	54
3.2.2. Hervorrufen einer T _H 1-Immunantwort durch IFN- α - <i>FastDCs</i>	57
3.2.3. <i>Priming</i> naiver T-Zellen durch IFN- α - <i>FastDCs</i>	59
3.2.4. Das Zytokinprofil von <i>FastDCs</i> und IFN- α - <i>FastDCs</i>	60
4. Diskussion.....	63
4.1. Übersicht über die experimentellen Befunde.....	63
4.2. Ergebnisinterpretation im Vergleich mit der Literatur.....	64
4.2.1. Induktion einer Antigen-spezifischen Immunantwort mit <i>FastDCs</i>	64
4.2.1.1. Bisherige Kenntnisse zur Generierung dendritischer Zellen.....	64
4.2.1.2. Stimulation einer Tumorantigen-spezifischen Immunantwort.....	65
4.2.1.3. Induktion Antigen-spezifischer zytotoxischer T-Zellen durch <i>FastDCs</i> ..	66
4.2.1.4. Vorteile durch die verbesserte Ausbeute und Reinheit der <i>FastDCs</i>	67
4.2.2. Modifikation des <i>FastDC</i> -Protokolls.....	68
4.2.2.1. Effekte von IFN- α auf <i>FastDCs</i>	68
4.2.2.2. Verhalten der <i>FastDCs</i> in der <i>wash-out</i> Kultur.....	69
4.2.2.3. Stimuli zur terminalen Ausreifung von <i>FastDCs</i>	70
4.2.2.4. Induktion von T-Gedächtniszellen durch IFN- α - <i>FastDCs</i>	71
4.2.2.5. Auswirkung von IFN- α auf die Zytokinproduktion der <i>FastDCs</i>	71
4.3. Klinische Relevanz der Ergebnisse.....	73
5. Zusammenfassung.....	74
6. Literaturverzeichnis.....	76
7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme.....	87
8. Danksagung.....	89
9. Veröffentlichungen.....	90
10. Lebenslauf.....	93

1. Einleitung

1.1. Das humane Immunsystem

Der menschliche Körper ist während des gesamten Lebens ständig zahlreichen Erregern, Noxen und anderen körperfremden Stoffen ausgesetzt. Für die Abwehr und Bekämpfung dieser Pathogene und die Erhaltung seiner eigenen Individualstruktur steht ihm das Immunsystem zur Verfügung. Dieses muss körperfremde Organismen und Proteine, so genannte Antigene, erkennen und beseitigen können, ohne das körpereigene gesunde Gewebe anzugreifen. Die wichtigste Fähigkeit des Immunsystems ist die Unterscheidung zwischen „Eigen“ und „Fremd“, wobei unter „Fremd“ nicht nur eingedrungene Mikroorganismen sondern auch anomale, z.B. maligne entartete Zellen oder virusinfizierte Zellen verstanden werden. Das menschliche Immunsystem wird in zwei Komponenten unterteilt: das angeborene (unspezifische) und das erworbene (spezifische oder adaptive) Immunsystem.

1.1.1. Das angeborene Immunsystem

Die angeborene oder unspezifische Immunität sind vom Erregertyp unabhängige Abwehrmechanismen, bei denen es sich um angeborene Fähigkeiten und Reaktionen des Immunsystems handelt. So zählen beispielsweise bakterizide Stoffe in Sekretionsprodukten, verschiedene Zytokine, das Komplementsystem und aus Entzündungszellen (Makrophagen und neutrophile Zellen) freigesetzte Mediatoren wie Histamin oder Prostaglandine zu dem unspezifischen Immunsystem. Wichtiges Prinzip der angeborenen Immunabwehr ist die Erstbekämpfung vieler üblicher Mikroorganismen und bakterieller Infektionen, um eine Infektion bis zum Einsetzen der adaptiven Immunabwehr in Schach zu halten und die adaptive Immunabwehr mit zu aktivieren. Mikroorganismen, wie beispielsweise Bakterien, die in den Körper eindringen, werden sofort von Makrophagen erkannt, angegriffen und phagozytiert. Dies geschieht über Rezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen, die gegen allgemein vorkommende Bakterienbestandteile gerichtet sind. Kommt es zur Bindung an den Rezeptor, wird das Bakterium aufgenommen und der Makrophage aktiviert. Er sezerniert dann Zytokine (von Zellen freigesetzte Proteine, die das Verhalten anderer Zellen beeinflussen, welche Rezeptoren für diese Proteine besitzen) und Proteine namens Chemokine. Zellen wie

Monozyten oder neutrophile Zellen, die passende Chemokinrezeptoren besitzen, werden so aus dem Blut „angelockt“ und migrieren ins betroffene Gewebe. Diesen Vorgang, der durch aktivierte Makrophagen als Reiz auf Pathogene ausgelöst wird, nennt man Entzündung. Antigene, die mit Antigen präsentierenden Zellen (APCs) über den afferenten Lymphstrom vom Entzündungsherd zum lymphatischen Gewebe transportiert wurden, führen zu einer Aktivierung von Lymphozyten, die ebenfalls zum Entzündungsherd wandern. Da die Aktivierung des adaptiven Immunsystems mehrere Tage dauert, ist das angeborene Immunsystem ein wichtiger Bestandteil, um Infektionen zwischenzeitlich zu bekämpfen. Wie oben beschrieben, erkennt die unspezifische Immunabwehr, über im Genom kodierte Rezeptoren, bestimmte Pathogene und kann eingedrungene Mikroorganismen normalerweise am ungehemmten Wachstum im Körper hindern. Sie hat jedoch keine Möglichkeit zur Entwicklung eines Gedächtnisses. Ihr fehlt damit die wichtigste Eigenschaft der erworbenen Immunabwehr: die lang anhaltende Erinnerung an Pathogene.

1.1.2. Das erworbene Immunsystem

Unter der spezifischen oder adaptiven Immunabwehr versteht man die Reaktion Antigen-spezifischer Lymphozyten auf ein Antigen, worunter auch die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses fällt. Man kann generell zwei Lymphozytenarten unterscheiden: B-Zellen und T-Zellen. Um die Vielzahl der Pathogene, mit der ein Organismus im Leben konfrontiert ist, zu erkennen und zu bekämpfen, sind Lymphozyten mit einer Vielfalt an unterschiedlichen Antigenrezeptoren ausgestattet. Diese werden somatisch während der Lymphozytenreifung durch Rekombination der Rezeptorkodierenden Gene so angelegt, dass jeder Lymphozyt mit einem strukturell einzigartigen Antigenrezeptor ausgestattet ist. Trifft nun ein Lymphozyt auf ein Antigen, das an seinen Rezeptor bindet, kommt es zur Aktivierung, Proliferation und Ausdifferenzierung in eine Effektorzelle, die einen Erreger vernichten kann. Ein Teil dieser proliferierenden Lymphozyten differenziert zu Gedächtniszellen, die schnell auf ein erneutes Auftreten desselben Krankheitserregers reagieren können.

Die Antigen erkennenden Moleküle der B-Zellen werden Immunglobuline (Ig) genannt, wobei jede B-Zelle nur ein Immunglobulin mit einer einzigen Spezifität synthetisiert. Immunglobuline können entweder membrangebunden an der B-Zell-Oberfläche, als so genannter B-Zell-Rezeptor, oder als ungebundener Antikörper vorkommen. Die wesentliche Funktion von B-Zellen besteht in der Sekretion von Antikörpern, die Pathoge-

ne oder deren toxische Produkte in den extrazellulären Räumen des Körpers binden. Die Antigenrezeptoren der T-Zellen existieren ausschließlich als membrangebundene Proteine und haben die alleinige Aufgabe, T-Zellen zu aktivieren. Im Gegensatz zum B-Zell-Rezeptor erkennt und bindet der T-Zell-Rezeptor (TCR) jedoch „sein“ passendes Antigen nicht in nativer Form, sondern nur als kurzes Peptidfragment, das in Verbindung mit dem MHC-Komplex auf der Oberfläche von anderen Zellen präsentiert wird. T-Zellen sind auf Wechselwirkungen mit anderen Zellen spezialisiert, das heißt entweder töten sie Zellen, die mit intrazellulären Pathogenen infiziert sind und körperfremde Peptide auf ihrer Oberfläche tragen, oder sie interagieren mit Zellen des Immunsystems, die ein fremdes Antigen aufgenommen haben und es auf der Oberfläche präsentieren. Sie brauchen deshalb keinen löslichen, sezernierten Rezeptor.

1.2. Dendritische Zellen und T-Zellen

Dendritische Zellen (DCs) sind hochspezialisierte, Antigen präsentierende Zellen, die in einzigartiger Weise eine T-Zell vermittelte Immunreaktion induzieren und kontrollieren können [Banchereau, 2000; Banchereau und Steinman, 1998]. Neben DCs fungieren auch noch B-Zellen und Makrophagen als APCs, DCs verfügen aber über die meisten stimulatorischen Moleküle und sind am potentesten hinsichtlich der Aktivierung von T-Zellen. T-Zellen können ganz allgemein in zwei Gruppen unterteilt werden: $CD8^+$ T-Zellen und $CD4^+$ T-Zellen. CD4 und CD8 dienen als Korezeptoren des TCRs und bestimmen, ob die Zelle an MHC-I- oder MHC-II-Moleküle gebundene Antigene erkennt. $CD4^+$ T-Zellen binden an MHC-II- und $CD8^+$ T-Zellen an MHC-I-Komplexe.

1.2.1. Die dendritischen Zellen

DCs wurden erstmals 1973 von Steinmann und Cohn in der Milz von Mäusen beschrieben und aufgrund ihrer vielen astartigen Ausläufer nach dem griechischen Ausdruck „dendros“ (Baum) dendritische Zellen benannt [Steinman und Cohn, 1973]. Inzwischen ist bekannt, dass DCs nicht nur in anderen lymphatischen Geweben, sondern auch in nicht-lymphatischen Geweben vorkommen. DCs stammen von hämatopoetischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ab und werden mit dem Blut in peripheres Gewebe transportiert. Dort bilden sie ein dichtes Netzwerk und analysieren ihre Umgebung, indem sie beispielsweise extrazelluläre Bestandteile durch Endozytose

oder Phagozytose aufnehmen, zu Peptiden prozessieren und diese an MHC-Moleküle gebunden an ihrer Oberfläche präsentieren. Potentiell gefährliche Antigene werden somit für T-Zellen „sichtbar“ gemacht, die Antigene erst als prozessierte Peptide im MHC-Kontext erkennen können. Jegliche Art von Entzündung oder anderer Gefahrensignale veranlasst DCs, das Gewebe zu verlassen und in die drainierenden Lymphknoten auszuwandern, wo sie in den T-Zell Arealen mit ungeprägten (naiven) T-Zellen interagieren. Abhängig von ihrem Aktivierungsgrad können DCs entweder Toleranz gegenüber dem präsentierten Antigen induzieren oder eine spezifische T-Zell-Immunantwort initiieren. Eine spezifische adaptive Immunantwort wird erst dann ausgelöst, wenn T-Zellen ihr spezifisches Peptid im MHC-Komplex erkennen und zusätzlich durch kostimulatorische Moleküle der DCs aktiviert werden.

Beim Menschen sind drei DC-Subpopulationen mit charakteristischen Merkmalen und Funktionen bekannt: myeloide DCs, plasmazytoide DCs und die Langerhans-Zellen der Haut [Banchereau, 2000; Bhardwaj, 2003; Palucka und Banchereau, 1999]. Aufgrund ihrer einzigartigen Fähigkeit, eine Antigen-spezifische Immunantwort induzieren zu können, werden sie für verschiedene Strategien der Immuntherapie und Tumorstimmung eingesetzt. Hier sind vor allem die myeloiden DCs interessant, da diese eine sehr hohe Kapazität zur Antigenaufnahme besitzen, mehr als beispielsweise Langerhans-Zellen. *In vivo* kommen DCs nur in sehr geringen Mengen vor, sie machen weniger als 1% der zirkulierenden peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMCs, Leukozyten ohne Granulozyten) aus. Sowohl die Isolation als auch die Kultivierung dieser Zellen ist schwierig und aufwändig. Nachdem bekannt wurde, dass man DCs *in vitro* auch aus CD34⁺ Vorläuferzellen und CD14⁺ Monozyten generieren kann [Caux, 1992; Romani, 1994; Sallusto und Lanzavecchia, 1994], war es möglich die Zellen genauer zu analysieren und verbesserte Strategien zur *in vitro* Generierung zu entwickeln. Ganz allgemein kann man bei DCs zwei Entwicklungsstufen unterscheiden: unreife DCs, die auf Antigenaufnahme und Prozessierung spezialisiert sind und reife DCs, die Antigene präsentieren.

1.2.2. Unreife dendritische Zellen

Es ist *in vitro* möglich, unreife DCs aus nicht-proliferierenden CD14⁺ Monozyten des peripheren Blutes durch die Zugabe von Zytokinen wie Interleukin-4 (IL-4) und *granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor* (GM-CSF) zu generieren. Unreife DCs zeichnen sich vor allem durch ihre hohe Kapazität zur Antigenaufnahme aus

[Banchereau, 2000; Cella, 1997b], und können aber nur geringe T-Zell-Proliferation in einer allogenen gemischten Lymphozytenreaktion (MLR) induzieren [Jonuleit, 1997]. Phänotypisch sind unreife DCs unter anderem dadurch charakterisiert, dass sie den Monozytenmarker CD14 auf ihrer Oberfläche nicht mehr exprimieren und den DC-Reifemarker CD83 noch nicht aufweisen. Desweiteren präsentieren sie auf ihrer Oberfläche nur eine geringe Menge von MHC-Komplexen und kostimulatorischen Molekülen wie CD80, CD86 oder CD40 [Banchereau, 2000; Romani, 1996]. Um auf verschiedene Entzündungsreize reagieren zu können, exprimieren unreife DCs unterschiedliche Rezeptoren, die es ihnen ermöglichen, entlang eines Chemokingradienten zu dem Entzündungsherd zu gelangen, um dort Pathogene aufzunehmen [Dieu, 1998; Sallusto und Lanzavecchia, 2000]. Unreife DCs verfügen über mehrere Mechanismen, wie beispielsweise Makropinozytose, rezeptorvermittelte Endozytose oder Phagozytose, die ihnen eine effiziente Antigenaufnahme ermöglichen [Banchereau, 2000]. Zur Induktion einer adaptiven Immunantwort müssen unreife DCs internalisierte Antigene zu Peptiden prozessieren und gebunden an MHC-Molekülen auf der Oberfläche präsentieren. Nach der gezielten Migration in den Lymphknoten können sie dort naive T-Zellen aktivieren.

1.2.3. Reifung dendritischer Zellen

Damit unreife DCs naive T-Zellen aktivieren können, müssen sie selbst zuerst aktiviert und somit in reife DCs umgewandelt werden. Dies kann beispielsweise durch mikrobielle Stimuli, T-Zell-abhängige Signale oder proinflammatorische Moleküle erfolgen [Cella, 1996; Jonuleit, 1997; Kalinski, 1999]. Unreife DCs liefern den T-Zellen nur das spezifische Antigen, nicht jedoch eine adäquate Kostimulation durch CD80 und CD86, so dass Toleranz bzw. Anergie gegenüber dem Antigen induziert wird. Erst voll aktivierte DCs mit ausreichend kostimulatorischen Molekülen sind in der Lage, eine spezifische T-Zell-Antwort zu initiieren [Shortman und Heath, 2001].

In vitro konnte gezeigt werden, dass sich Monozyten durch zwei Schritte, Differenzierung und Aktivierung, in fertig ausgereifte DCs umwandeln lassen, wohingegen unreife DCs sich bei fehlendem Zytokineinfluss wieder in Makrophagen zurückverwandeln können [Palucka, 1998; Romani, 1996]. Durch die Weiterentwicklung zur reifen DC verändern sich sowohl Phänotyp als auch funktionelle Eigenschaften der Zelle. Es kommt zu einer gesteigerten Expression des spezifischen DC-Reifemarkers CD83, sowie der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86, CD40 und den MHC-Komplexen

auf der Oberfläche, wodurch eine effektive Antigenpräsentation möglich ist [Banchereau, 2000; Romani, 1996]. Außerdem werden vermehrt immunstimulatorische Zytokine, wie Interleukin-12 (IL-12), produziert [Cella, 1997a; Mosca, 2000]. Gleichzeitig kommt es auch zu einer Umstrukturierung im Expressionsmuster der Chemokinrezeptoren (CCR). So besitzen reife DCs beispielsweise eine große Anzahl von CCR-7, ein Rezeptor, mit dessen Hilfe sie auf Chemokine reagieren können, die sie in die lymphatischen Bahnen und in die T-Zell Areale im Lymphknoten dirigieren [Randolph, 2001; Sallusto und Lanzavecchia, 2000; Sozzani, 1998]. Durch eine zweistufige Generierung *in vitro* kann man also aus Monozyten reife DCs gewinnen, die alle wichtigen Eigenschaften zur Induktion einer effizienten adaptiven T-Zell-Immunantwort *in vivo* aufweisen.

1.2.4. Antigenpräsentation durch dendritische Zellen

In nahezu allen peripheren Gebieten des Körpers nehmen DCs extrazelluläres Antigen auf, prozessieren es und präsentieren Fragmente davon in ihren MHC-Molekülen auf der Oberfläche, um sie dadurch für T-Zellen „sichtbar“ zu machen. Die MHC-Komplexe lassen sich in die zwei großen Gruppen MHC-I und MHC-II unterteilen, wodurch entweder zytotoxische CD8⁺ T-Zellen (CTL) oder CD4⁺ T-Helferzellen (T_H) aktiviert werden können. MHC-I-Moleküle werden von nahezu allen Zellen des Körpers exprimiert, wohingegen MHC-II-Komplexe nur auf der Oberfläche von APCs zu finden sind. Intrazelluläre Antigene aus dem Zytosol der DCs werden zu Peptiden prozessiert, durch MHC-I-Komplexe auf ihrer Oberfläche präsentiert und führen dann zu einer Aktivierung von CTLs, welche direkt die Zielzellen lysieren können. Aus dem Extrazellulärraum aufgenommene Moleküle werden prozessiert und mittels MHC-II-Komplexen präsentiert, wodurch immunregulatorische T-Helferzellen aktiviert werden. Zusätzlich können DCs auch exogene Antigene über MHC-I-Moleküle CD8⁺ T-Zellen präsentieren, was als „*cross-presentation*“ bezeichnet wird [Banchereau, 2000; Guermonprez, 2002]. DCs sind zudem die einzigen APCs, die alleine CD8⁺ T-Zellen aktivieren können, da sie über genügend kostimulatorische Moleküle verfügen [Mehta-Damani, 1994]. B-Zellen und Makrophagen sind zwar in der Lage, T-Helferzellen zu aktivieren, benötigen aber für die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen die Unterstützung von CD4⁺ T-Zellen, da ihre kostimulierende Kapazität nicht ausreicht. Da DCs aber auch körpereigene „harmlose“ Antigene aufnehmen und präsentieren, muss dieses System einer strengen Kon-

trolle unterliegen, damit keine überschießenden Reaktionen gegen das eigene, gesunde Gewebe stattfinden.

1.2.5. Toleranz oder Auslösen einer Immunantwort

Abhängig von ihrem Aktivierungsgrad sind DCs in der Lage, entweder Toleranz gegen das präsentierte Antigen zu induzieren oder die adaptive Immunantwort zu aktivieren. Zur Induktion einer T-Zell vermittelten Immunantwort kommt es nur, wenn T-Zellen das für sie passende Antigen in prozessierter Form MHC-gebunden auf der Oberfläche von DCs erkennen und sie zusätzlich durch kostimulatorische Moleküle der DCs aktiviert werden. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die Induktion einer effektiven T-Zell vermittelten Immunantwort stark vom kostimulatorischen Potential der DCs abhängig ist. So können unreife DCs den T-Zellen zwar das Antigen zeigen, wenn auch lange nicht so effektiv wie reife DCs, lösen aber wegen ihrer geringen kostimulatorischen Kapazität eine Toleranz beziehungsweise Anergie in den T-Zellen gegenüber diesem Antigen aus [Dhodapkar, 2001; Shortman und Heath, 2001; Steinman, 2000]. Erst voll ausgereifte DCs, mit starkem kostimulatorischen Potential, sind in der Lage, eine Antigen-spezifische effiziente T-Zell vermittelte Immunantwort auszulösen [Shortman und Heath, 2001].

1.2.6. Aktivierung von T-Zellen durch dendritische Zellen

Jegliche Art von Gefahrensignal kann eine Aktivierung von DCs bewirken, die dann verstärkt MHC-Antigen-Komplexe und kostimulatorische Moleküle exprimieren und umgehend in die lymphatischen Gewebe, wie drainierende Lymphknoten oder Milz wandern, wo sie auf naive T-Zellen treffen. Nachdem ungeprägte T-Zellen zum ersten Mal ihr passendes Antigen auf der DC Oberfläche erkannt haben und dadurch aktiviert wurden, ein Vorgang, der *priming* genannt wird, wandeln sie sich in Effektorzellen um. Dabei kommt es zur Proliferation und klonalen Vermehrung der ursprünglich einzelnen Zelle und zur Differenzierung in Effektorzellen, die dann eine effiziente Immunantwort bewirken können. Die Differenzierung in Effektorzellen führt in den T-Zellen zu unterschiedlichen Veränderungen, wie beispielsweise die Expression bestimmter Zytokine, oder eine vereinfachte Aktivierung nach erneutem Antigenkontakt ohne zusätzliche Stimulation [Santana und Rosenstein, 2003]. Je nachdem ob die Antigenpräsentation durch MHC-I- oder MHC-II-Komplexe stattfindet, werden CD8⁺ oder CD4⁺ T-Zellen

aktiviert. $CD8^+$ T-Zellen differenzieren sich zu CTLs, die Zytokine wie Interferon- γ ($IFN-\gamma$) produzieren oder ihre Zielzellen direkt lysieren können, wohingegen sich $CD4^+$ T-Helferzellen in T_H1 - oder T_H2 -Zellen differenzieren können (Übersicht [Abbas, 1996; Murphy und Reiner, 2002]). T_H1 -Zellen sezernieren $IFN-\gamma$ und fördern die zelluläre Immunantwort, indem sie Makrophagen und $CD8^+$ T-Zellen bei der Elimination intrazellulärer Pathogene und Tumorzellen unterstützen. T_H2 -Zellen hingegen sezernieren vor allem die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 und fördern die humorale Immunantwort, indem sie B-Zellen vermehrt zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen ausreifen lassen und die Degranulation von Mastzellen induzieren, wodurch vorwiegend extrazelluläre Antigene beseitigt werden können [Murphy und Reiner, 2002; Santana und Rosenstein, 2003]. Die Auslösung einer T_H1 - oder T_H2 -vermittelten Immunantwort wird vor allem durch die von DCs produzierten Zytokine IL-12 und IL-4 bestimmt, wobei zusätzlich noch anderen Faktoren wie Menge des Antigens oder Dauer der T-Zell-Rezeptor-Interaktion und Art der Kostimulation eine Rolle spielen [Langenkamp, 2000].

In einem limitierten Zeitraum nach Aktivierung produzieren von Monozyten abgeleitete DCs vermehrt IL-12, ein bekanntes „Schlüssel-Zytokin“ zur Induktion einer T_H1 -gewichteten Immunantwort [Langenkamp, 2000], dessen Produktion durch die Interaktion von DCs mit T-Zellen über CD40/ CD40-L (CD40-Ligand) zusätzlich noch gesteigert werden kann [Cella, 1996].

Es ist bekannt, dass DCs unmittelbar nach der Aktivierung wegen ihrer erhöhten IL-12 Produktion vor allem eine starke T_H1 -Immunantwort und zu einem späteren Zeitpunkt eher eine T_H2 -vermittelte Immunantwort induzieren [Langenkamp, 2000]. Dieser Mechanismus trägt wahrscheinlich dazu bei, dass aktivierte DCs nach Eintreffen im Lymphknoten zuerst eine starke Immunantwort hervorrufen und später mit abnehmender Zytokinproduktion eine überschießende Immunreaktion (und dadurch entstehende Schäden) vermeiden können [Gauzzi, 2002]. Zusammenfassend kann man sagen, dass DCs, als Teil der angeborenen Immunität, in einzigartiger Weise das System der adaptiven Immunabwehr regulieren und somit als Bindeglied zwischen beiden eine wichtige Rolle in der Abwehr körperfremder Antigene einnehmen.

1.3. Dendritische Zellen in der Tumorimmuntherapie

Tumorzellen exprimieren oft spezifische Antigene und Proteine, die von T-Zellen zwar erkannt werden, ohne jedoch eine effektive Immunantwort auszulösen; vielmehr induzieren sie häufig Toleranz. Das liegt unter anderem daran, dass diese Antigene oft auch in geringer Zahl auf körpereigenen Zellen vorkommen und Tumorzellen zudem über unterschiedliche Mechanismen verfügen, um einer Immunantwort zu entgehen. Hierzu zählen beispielsweise die Sekretion immunsuppressiver Faktoren wie TGF- β (Tumor growth factor), der Tumorantigenverlust oder auch das Herunterregulieren von MHC-I-Molekülen [Gilboa, 1999]. Für eine körpereigene effiziente Tumorerkennung und Beseitigung ist es wichtig, diese Toleranz zu umgehen und das adaptive Immunsystem spezifisch gegen die Tumorzellen zu richten. Da DCs die Eigenschaft besitzen, naive T-Zellen zu *primen* (Aktivierung und klonale Vermehrung nach Erstkontakt mit Antigen) und somit eine Antigen-spezifische Immunantwort induzieren können, sind sie ideale Kandidaten für den Einsatz in der Immuntherapie maligner Tumore. Eine solche DC-Vakzinierung beinhaltet mehrere Schritte: Aus dem Blut der Patienten werden autologe DCs isoliert, diese *ex vivo* mit Tumor-spezifischem Antigen beladen, ausgereift und anschließend dem Patienten wieder zugeführt, mit der Idee, so eine spezifisch gegen die Tumorzellen gerichtete Immunantwort induzieren zu können. Die erste klinische Studie zur DC-Vakzinierung wurde an Patienten mit B-Zell-Lymphom durchgeführt und 1996 von Hsu et al. beschrieben [Hsu, 1996]. Bei verschiedenen anderen bösartigen Tumoren, wie Melanom oder Prostatakarzinom, konnte ebenfalls gezeigt werden, dass man mit unterschiedlichen Arten der *in vitro* Beladung von DCs mit Tumor-assoziierten Antigenen eine Tumor-spezifische zytotoxische Immunantwort *in vivo* induzieren kann, die bei manchen Patienten sogar zu einer Tumorregression führte [Banchereau, 2001; Fong, 2001; Heiser, 2002; Nestle, 1998; Schuler-Thurner, 2000]. Alles in allem sind die Ergebnisse der DC-basierten Immuntherapie sehr vielversprechend, obwohl eine einheitliche Ergebnisinterpretation durch die große Variabilität zwischen den Studien erschwert wird. So wurden in die klinischen Studien unterschiedliche Tumore einbezogen, jeweils immer nur relativ wenige Patienten vakziniert und verschiedene Strategien zur DC-Präparation, Antigen-Beladung und Vakzinierungsform gewählt [Cerundolo, 2004; Figdor, 2004]. Außerdem wurden für die Studien nur Patienten mit fortgeschrittenem Krankheitsstadium zugelassen, die meist bereits durch Chemo- oder Strahlentherapie ein vorgeschädigtes Immunsystem hatten und deswegen möglicherweise schlechter als gedacht auf die Immuntherapie angesprochen ha-

ben [Reichardt, 2004]. Um die Tumorimmuntherapie genauer zu analysieren und zu verbessern sind deswegen größere Studien mit ausgewählten Patienten, einheitlichen DC-Präparationen und standardisierten Methoden zur Überwachung der induzierten Immunreaktion und deren klinische Korrelation nötig [Fong und Engleman, 2000; Reichardt, 2004; Schuler, 2003]. Möglicherweise kann dabei die Optimierung und Verkürzung der *in vitro* stattfindenden DC-Generierung die Evaluation der Tumorimmuntherapie erleichtern [Schuler, 2003].

1.4. Generierung dendritischer Zellen *in vitro*

Eine weit verbreitete Methode für die Generierung von DCs aus Monozyten (so genannte moDCs) setzt sich aus einer fünf bis sieben Tage dauernden Differenzierungsphase mit IL-4 und GM-CSF und einer anschließenden zwei bis drei Tage dauernden Aktivierungsphase mit unterschiedlichen Stimuli zusammen. Wie wiederholt gezeigt wurde, ist es aber auch möglich, DCs in wesentlich kürzerer Zeit aus Monozyten zu generieren [Czerniecki, 1997; Dauer, 2003a; Faries, 2001; Xu, 2003]. Unterschiedliche experimentelle Ansätze lassen zudem vermuten, dass die verkürzte Kulturdauer *in vitro* mehr den *in vivo* Bedingungen der DC-Ausreifung entspricht. So differenzieren sich Monozyten auch durch transendotheliale Migration oder Inkubation mit Interferon- α (IFN- α), ein wichtiges Zytokin sowohl für das angeborene als auch das erworbene Immunsystem, innerhalb von zwei bis drei Tagen zu DCs [Randolph, 1998; Santini, 2000]. Auch unsere Arbeitsgruppe hat sich in den vergangenen Jahren damit beschäftigt, den Generierungsprozess soweit wie möglich zu verkürzen und dabei ein Protokoll entwickelt, mit dem man reife DCs in nur 48 Stunden aus Monozyten generieren kann [Dauer, 2003a]. Beim Vergleich dieser so genannten *FastDCs* mit Standard-moDCs zeigte sich, dass die *FastDCs* nicht nur phänotypisch reif waren, sondern auch in der Lage waren, auf Chemokine aus dem Lymphknoten zu migrieren. Zudem wiesen sie ein gleichwertiges Potential zur Induktion autologer T-Zell-Proliferation und zum *priming* naiver T-Zellen auf [Dauer, 2003a]. Für eine erfolgreiche Tumorimmuntherapie mit DCs müssen die verwendeten DCs vor allem in der Lage sein, eine Tumorspezifische zytotoxische T-Zell-Antwort zu induzieren. Diese Eigenschaft wurde bisher für die *FastDCs* nicht vollständig analysiert und ist Teil der vorliegenden Arbeit.

1.5. Strategien zur Verbesserung des *FastDC*-Protokolls

In den letzten Jahren wurde intensiv an der Optimierung der DC-Generierung aus Monozyten gearbeitet. Dabei stand immer die Untersuchung der Differenzierungs- und Aktivierungsphase im Vordergrund, aber nur sehr selten wurde die Dauerhaftigkeit des Reifezustandes und das Überleben der DCs analysiert. Als ein Reifekriterium wurde das Beibehalten der phänotypischen Reife nach Zytokinentzug festgelegt, ein Hinweis auf terminale Differenzierung [Palucka, 1998; Romani, 1996; Thurner, 1999]. Diese Stabilitätstests wurden aber nur für maximal ein bis zwei Tage durchgeführt und die DCs anschließend nicht im Detail analysiert. Soweit bekannt, hat sich nur eine Arbeitsgruppe genauer mit dem Überleben von DCs, die nach der Generierung ohne weitere Zytokine kultiviert wurden, über einen längeren Zeitraum beschäftigt [Feuerstein, 2000]. Obwohl im Allgemeinen davon ausgegangen wird, dass reife DCs vollständig ausgereifte Zellen sind, die sich nicht mehr in unreife Vorstufen umwandeln können, wurde das noch nicht im Detail untersucht. Desweiteren fehlen auch konkrete Untersuchungen dazu, ob Veränderungen der Zytokine oder Aktivierungssignale in der DC-Kultur Einfluss auf Überleben und Aufrechterhaltung der phänotypischen Reife haben. Da Stabilität, Überleben und vollständige Ausreifung wichtige Kriterien für eine effiziente DC-Vakzinierung sind, wurden diese Punkte im zweiten Teil der Arbeit für das *FastDC*-Protokoll analysiert.

Von mehreren anderen Arbeitsgruppen wurde beschrieben, dass man mit GM-CSF und IFN- α *in vitro* innerhalb kürzerer Zeit reife DCs generieren kann, die im Gegensatz zu den Standard-moDCs (IL-4 und GM-CSF) besser dazu geeignet seien, eine T_H1-Immunantwort und CTL vermittelte zytotoxische Immunreaktion zu induzieren [Gabriele, 2004; Parlato, 2001; Santini, 2000]. Zusammen mit IFN- β gehört IFN- α der Familie der Typ-I-Interferone an, die als frühe Antwort auf eine virale Infektion von verschiedenen Zellen wie Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen und Fibroblasten gebildet werden. Ursprünglich wurden sie durch ihre antivirale Wirkung bekannt, wobei sie zusätzlich noch antiproliferative und vielfältige andere immunregulatorische Aktivitäten besitzen (Übersicht: [De Maeyer und De Maeyer-Guignard, 1998; Herberman, 1997]). Auch unsere Arbeitsgruppe hat die moDC-Generierung mit IFN- α untersucht. Der Vergleich von moDCs generiert mit GM-CSF und IFN- α oder mit GM-CSF und IL-4 zeigte, dass die moDCs mit IFN- α eine geringere IL-12 Produktion besitzen, eine verminderte Expression von CCR-7, CD83 und CD86 aufweisen und weniger effektiv die Proliferation von allogenen oder Antigen-spezifischen autologen T-Zellen

induzieren können. Die Endozytose-Kapazität war in beiden DC-Gruppen gleichwertig [Dauer, 2003b]. Mögliche Gründe für die Diskrepanz der genannten Befunde sind möglicherweise die unterschiedlich verwendeten Zytokinkonzentrationen oder die benutzten verschiedenen Typ-I-Interferone. Wie von unserer Arbeitsgruppe gezeigt, führte die Differenzierung der moDCs mit GM-CSF, IL-4 und zusätzlich IFN- α zu einer eingeschränkten IL-12 Produktion. Ansonsten waren sie jedoch mit den GM-CSF/IL-4 DCs vergleichbar [Dauer, 2003b]. Demnach ist IL-4 ein wichtiges Zytokin zur DC-Generierung *in vitro*, aber möglicherweise hat IFN- α einen zusätzlichen positiven Effekt auf die Stimulation einer T_H1-Immunantwort *in vivo*.

1.6. Fragestellung

Hauptziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der *FastDCs* in Bezug auf das Auslösen einer Tumorantigen-spezifischen zytotoxischen T-Zell-Antwort. Obwohl schon vergleichende Untersuchungen zwischen moDCs und *FastDCs* durchgeführt wurden [Dauer, 2003a], war formal noch nicht bewiesen, dass *FastDCs* auch tatsächlich in der Lage sind, Tumorantigen-spezifische CTLs zu induzieren. Im ersten Teil der Arbeit wurde dieser Punkt untersucht und zugleich eine vergleichende Analyse zwischen den bisher verwendeten moDCs und den *FastDCs* durchgeführt. Der Schwerpunkt des Vergleichs lag hierbei auf der Ausbeute und Reinheit der DCs, ihrer Zytokinproduktion und ihrer Fähigkeit zur Induktion einer Antigen-spezifischen Immunantwort. Im zweiten Teil wurde untersucht, ob es möglich ist, Stabilität und Reife der *FastDCs* weiter zu verbessern. Dabei wurde analysiert, inwieweit der Einsatz zusätzlicher immunregulatorischer Zytokine wie IFN- α bei der DC-Generierung Einfluss auf spätere Reife, Zytokinproduktion und Kapazität zur Induktion von T-Zell-Proliferation hat. Insgesamt kann man die vorliegende Arbeit somit in zwei Themenkomplexe unterteilen: Der direkte Vergleich von *FastDCs* mit moDCs und eine mögliche Verbesserung des *FastDC* - Protokolls in Bezug auf Stabilität und Reife der genannten Zellen. Folgend Fragestellungen wurden bearbeitet:

- Ist es möglich mit *FastDCs* Tumor-spezifische CTLs zu *primen* und sind *FastDCs* den moDCs in dieser Hinsicht ebenbürtig?
- Unterscheiden sich *FastDCs* von moDCs in Bezug auf Ausbeute, Reinheit und Zytokinproduktion?

- Beeinflussen unterschiedliche Zytokine und Aktivierungsstimuli die Stabilität und Reife von *FastDCs*?
- Wenn dies der Fall ist, wie wirkt sich das auf Zytokinproduktion und Fähigkeit zur T-Zell-Aktivierung aus?

2. Material und Methoden

2.1. Zellulär-Immunologische Methoden

2.1.1. Zellkultur von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

2.1.1.1. Allgemeine Zellkulturbedingungen

Alle Zellkulturen erfolgten in einem Begasungsbrutschrank bei einer Temperatur von 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem 5 %igen CO₂/Luftgemisch. Alle Experimente und Handhabungen mit Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in einer Lamina-Air-Flow vorgenommen.

2.1.1.2. Blutabnahme

Mononukleäre Zellen wurden aus dem peripheren Blut gesunder Spender gewonnen. Für jeden Versuch wurde jeweils vier freiwilligen, gesunden Spendern 200 ml peripher-venöses Vollblut abgenommen. Dafür wurden 50 ml Spritzen zuerst mit je 100 µl Heparin pro 10 ml Blut gefüllt und anschließend zur Blutabnahme verwendet. Das gewonnene Blut wurde anschließend sofort unter sterilen Bedingungen für die Zellisolation benutzt.

2.1.1.3. Isolation von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut

Die Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes, auch PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) genannt, erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation.

Das Blut eines Spenders wurde zu je 25 ml auf sterile 50 ml Röhrchen verteilt, und mit 0,9 %igem NaCl auf insgesamt 45 ml aufgefüllt. Vorsichtig, um Schaumbildung zu vermeiden, wurde der Inhalt vermischt. In frischen 50 ml Röhrchen wurden je 15 ml Ficoll vorgelegt, diese dann vorsichtig mit je 30 ml Blut/NaCl Gemisch überschichtet, so dass sich die Phasen nicht vermischten, und anschließend zentrifugiert (1000 g, 20°C, 20 Minuten (min), Beschleunigung 1, Bremsung 1). Nach der Dichtegradientenzen-

trifugation fand man folgende Schichtung von oben nach unten in den 50 ml Röhrchen vor: Plasma, Schicht aus mononukleären Zellen, Ficoll und Erythrozyten. Granulozyten sedimentieren, genauso wie Erythrozyten, aufgrund ihrer höheren Dichte in beziehungsweise unter das Ficoll. Die Thrombozyten bleiben in der Plasmaschicht. Vorsichtig wurde nun die Schicht der mononukleären Zellen in ein frisches 50 ml Röhrchen pipettiert, mit 0,9 %igem NaCl auf 45 ml aufgefüllt, und wiederum zentrifugiert (520 g, 20°C, 15 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4). Anschließend folgten zwei Waschstschritte, um die PBMCs von Thrombozyten und Plasmabestandteilen zu reinigen. Hierfür wurde der Überstand dekantiert, das Zellsediment in kleinen Volumina NaCl resuspendiert, und je vier Röhrchen mit Zellen eines Spenders in ein 50 ml Röhrchen gegeben, welches wiederum auf 45 ml mit NaCl aufgefüllt und zentrifugiert (300 g, 4°C, 10 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4) wurde. Dieser Schritt wurde wiederholt, so dass am Ende insgesamt nur noch ein Röhrchen mit Zellen pro Spender übrig blieb. Nach der abschließenden Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment in 20 ml DC-Medium (siehe 2.3.7.1) resuspendiert. Jeweils 5 ml dieser Zellsuspension wurden auf eine Zellkulturflasche (550 ml) verteilt, in denen je 15 ml DC-Medium vorgelegt waren.

2.1.1.4. Gewinnung von gereinigten Monozyten über Adhärenz-Selektion

Monozyten besitzen als einzige in der PBMC Fraktion die Fähigkeit zur Adhärenz, so dass sie sich an den Boden der Zellkulturflasche anhaften können, was man sich im Folgenden für die Isolation dieser Zellen zu Nutzen machte.

Damit die Monozyten optimale Bedingungen für die Adhärenz hatten, wurden die in DC-Medium resuspendierten PBMCs eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Dabei wurden die 550 ml Kulturflaschen liegend gelagert, um den Monozyten eine möglichst große Oberfläche für die Haftung zu bieten. Anschließend wurde das Medium mit der nicht-adhärennten Fraktion der PBMCs, hauptsächlich aus Lymphozyten bestehend, abgenommen und für zusätzliche Zellisolationen aufbewahrt.

Um die am Boden der Zellkulturflasche haftenden Monozyten zu reinigen, wurden 15 ml zimmerwarmes PBS in die Flaschen gegeben. Durch vorsichtiges Schwenken der Flasche in der Horizontalebene konnten die Monozyten von restlichen Lymphozyten befreit werden. Nach einer Wiederholung dieses Vorgangs wurden 20 ml frisches DC-Medium zu den Monozyten gegeben und diese über Nacht im Brutschrank inkubiert. In

dieser Zeit lösten sich die Zellen vom Flaschenboden ab und konnten am Folgetag einfach mit der Pipette in ein frisches 50 ml Röhrchen geerntet werden. Noch in der Flasche haftende Zellen wurden mit 15 ml kaltem PBS und durch vorsichtiges Schaben mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst und zu den übrigen Monozyten in das 50 ml Röhrchen gegeben. Zuletzt wurde die Flasche nochmals mit kaltem PBS gespült und dieses auch dem Röhrchen zugefügt. Die so geernteten Monozyten wurden zentrifugiert, gezählt und auf eine Konzentration von 1 Million/ml DC-Medium gebracht.

2.1.1.5. Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten

2.1.1.5.1. Das Standard-moDC-Protokoll

Um moDCs aus dem peripheren Blut der Spender (n=8) zu generieren, wurde das so genannte „Standard“-Protokoll verwendet [Schuler, 2003]. Die dadurch erhaltenen DCs werden im Weiteren mit moDCs abgekürzt. Hier soll nur kurz auf den Unterschied zum folgenden, genau aufgeschlüsselten, Protokoll der *FastDCs* eingegangen werden. Die Monozyten wurden mit IL-4 und GM-CSF für fünf Tage inkubiert und anschließend mit Interleukin-1 β (IL-1 β), Prostaglandin E₂ (PGE₂) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) über zwei Tage zu dendritischen Zellen ausgereift. Wie von unserer Arbeitsgruppe gezeigt, ist Interleukin-6 als Aktivierungsstimulus nicht von Bedeutung [Dauer, 2003a] und wurde weggelassen. In einer Versuchsanordnung mit vier Spendern wurden moDCs zusätzlich an Tag 3 und Tag 5 der Differenzierungsphase mit den gleichen Mengen an IL-4 und GM-CSF wie zu Anfang versetzt und anschließend über 24 oder 48 Stunden aktiviert.

2.1.1.5.2. Das *FastDC*-Protokoll

Für die Generierung von DCs aus Monozyten wurde jedoch hauptsächlich das in unserem Labor etablierte Protokoll der *FastDCs* [Dauer, 2003a] angewendet. Der Vorteil hierbei ist, dass die Generierung vom Monozyt zur reifen dendritischen Zelle in nur 48 Stunden im Vergleich zu sieben bis neun Tagen beim Standard-Protokoll möglich ist.

Über Adhärenz gewonnene Monozyten wurden nach dem Ernten gezählt und auf eine Konzentration von etwa 1 Million/ml DC-Medium eingestellt. Deren weitere Kultivierung

erfolgte in 6-Loch Platten, wobei pro Loch 2 Millionen Zellen, also 2 ml dieser Zellsuspension, angesetzt wurden. Die Zellen wurden mit 500 IU/ml IL-4 und 1000 IU/ml GM-CSF für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert, wodurch es zur Ausdifferenzierung der Monozyten in unreife dendritische Zellen kam [Dauer, 2003a]. In insgesamt 20 Kulturen wurde zusätzlich IFN- α (500 IU/ml) mit IL-4 und GM-CSF zur Differenzierung verwendet.

Der Differenzierungsphase folgte eine 24- bis 36-stündige Aktivierungsphase, in der die unreifen dendritischen Zellen mit proinflammatorischen Mediatoren zu reifen DCs aktiviert wurden. Dafür wurde die Kombination von 1 μ M PGE₂, 1000 IU/ml TNF- α und 10 ng/ml IL-1 β verwendet. Bei 4 Zellkulturen wurden zusätzlich zu den proinflammatorischen Mediatoren die Stimuli CD40-L (500 ng/ml) und IFN- γ (1000 IU/ml) für die letzten 12 bis 24 Stunden der Aktivierung zugefügt.

Nach der Aktivierungsphase der Zellen im Brutschrank wurden die nun fertig ausdifferenzierten und stimulierten *FastDCs* geerntet. Der Mediumüberstand wurde vorsichtig entnommen und für spätere Zytokinmessungen bei -20°C eingefroren. Die Zellen wurden in 1ml kaltem PBS mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturplatte gelöst und geerntet. Nach weiterem zweimaligen Spülen mit je 1ml kaltem PBS wurden die Zellen zentrifugiert (300g, 4°C, 10min), um sie von Zytokinresten zu befreien, und in frischem DC-Medium aufgenommen.

2.1.1.6. Beladung von dendritischen Zellen mit Antigen

Zur Induktion Antigen-spezifischer T-Zellen in autologen Kokulturen mit DCs wurden die dendritischen Zellen mit einem geeigneten Antigen beladen.

In acht Kulturen wurde das *Recall*-Antigen Tetanustoxoid (TT), also ein dem Immunsystem schon bekanntes Antigen, verwendet. Tetanustoxoid (5 μ g/ml) wurde zeitgleich mit den Zytokinen IL-4 und GM-CSF zu Beginn der Differenzierungsphase der *FastDCs* zu den Monozyten gegeben. In vier Zellkulturen wurden die Peptide Melan-A (Mel) und HIV-Pol (Pol) zur Beladung der *FastDC* und der moDCs eingesetzt. Für die Beladung der DCs mit diesen spezifisch hergestellten Peptiden ist keine Prozessierung nötig, und die Peptide können innerhalb kurzer Zeit durch MHC-I-Komplexe präsentiert werden. Aus diesem Grund wurden sowohl Melan-A (10 μ M) als auch HIV-Pol (10 μ M) jeweils nur für die letzten vier Stunden der Aktivierungsphase zu den DCs gegeben.

2.1.1.7. Charakterisierung von dendritischen Zellen nach zytokinfreier Kultivierung

Um die Oberflächenmarker, die terminale Differenzierung, die Reife und Stabilität, die Zytokinproduktion von *FastDCs* und ihre Fähigkeit zur Induktion von T-Zell-Proliferation zu untersuchen, wurden *FastDCs* ohne weiteren Einfluss von Zytokinen kultiviert, das so genannte *wash-out* Verfahren [Berger, 2002; Feuerstein, 2000].

Ausgereifte *FastDCs* wurden geerntet und durch das Spülen mit kaltem PBS und anschließender Zentrifugation gewaschen. Diese nun von Zytokinen befreiten *FastDCs* wurden in einer Konzentration von 1 Million/ml in frischem DC-Medium aufgenommen und ohne weiteren Zusatz von Zytokinen im Brutschrank bei 37°C kultiviert. In insgesamt acht Kulturen wurden *wash-out* Verfahren von zwei bis fünf Tagen durchgeführt. Alle 24 Stunden wurden die Zellen phänotypisch auf Überleben und Oberflächenmarker durchflusszytometrisch untersucht und das Zytokinprofil ermittelt.

2.1.1.8. Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Lebende Zellen wurden mit dem Trypanblau-Ausschlusstest dargestellt. Lebendige Zellen können den Farbstoff ausschließen und färben sich nicht an, wohingegen in tote Zellen Trypanblau eindringt und sie blau anfärbt. Es wurden Verdünnungen der Zellen mit Trypanblau hergestellt und je ein Aliquot von 10 µl unter das Deckglas einer Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Verdünnung wurde so eingestellt, dass etwa 50 Zellen pro Quadrant sichtbar waren. Ausgezählt wurden alle vier Quadranten, und die Zahl vitaler Zellen wurde folgendermaßen berechnet:

Zellzahl pro Milliliter = Mittelwert aus den 4 Quadranten x 10000 x Verdünnungsfaktor.

2.1.1.9. Isolation von T-Zellen mittels der magnetischen Zellsortierung

Zur Überprüfung der Fähigkeit der unterschiedlich generierten DCs zur Aktivierung von T-Zellen wurden T-Zellen aus der nicht-adhärenen Fraktion der mononukleären Zellen mit der *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS)-Methode isoliert. Hierbei werden die Zellen mit speziellen Antikörpern markiert, die an paramagnetische Mikropartikel gekoppelt sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Negativ-Selektion durchgeführt, bei der in zwei aufeinander folgenden Schritten alle Zellen der nicht-adhärenen Fraktion außer den T-

Zellen markiert und aussortiert wurden. Zunächst wurden die nicht-adhärenenten Zellen zentrifugiert und nach dem Dekantieren des Überstandes für 5 min bei Raumtemperatur mit 5 ml osmotisch wirksamem Erythrozyten-Lyse-Reagenz (siehe 2.3.2.) inkubiert, um darin noch enthaltene Erythrozyten zu lysieren. Nach einem darauf folgenden Waschschrift mit NaCl wurden die Zellen in MACS-Puffer (siehe 2.3.7.1.) suspendiert und durch Filtration mit einem 40 μm Nylonfilter gereinigt. Anschließend wurden die Zellen gezählt und abermals zentrifugiert, bevor sie dann in MACS-Puffer suspendiert wurden (80 $\mu\text{l}/10^7$ Zellen).

Für die erste Markierung wurden die Zellen mit *Hapten-Antibody-Cocktail* (10 $\mu\text{l}/10^7$ Zellen) inkubiert (10 min, 4°C). Dieser *Hapten-Antibody-Cocktail* enthält eine Mischung aus Hapten-gekoppelten Antikörpern gegen CD11b, CD16, CD19, CD36 und CD56 und bindet so an alle Zellen mit Ausnahme der T-Zellen, die auf diese Weise unberührt bleiben. Nach zweimaligem Waschen mit MACS-Puffer und Suspension der Zellen in MACS-Puffer (80 $\mu\text{l}/10^7$ Zellen) folgte der zweite Markierungsschritt durch Inkubation (15 min, 4°C) mit paramagnetisch markierten *Anti-Hapten-MicroBeads* (10 $\mu\text{l}/10^7$ Zellen), die an die ersten Antikörper binden. Anschließend wurde die markierte Zellsuspension noch einmal gewaschen, die Zellen in MACS-Puffer resuspendiert (500 $\mu\text{l}/10^8$ Zellen) und auf eine Trennsäule gegeben, die eine paramagnetische Matrix enthielt. Die Säule wurde in dem Magnetfeld eines starken Permanentmagneten platziert, mit MACS-Puffer angefeuchtet und die markierte Zelllösung in die Säule gegeben. Durch die paramagnetischen Partikel an den markierten Zellen blieben diese in der Matrix hängen, wohingegen die unmarkierten T-Zellen ungehindert die Säule passieren konnten und unten aufgefangen wurden. Durch mehrmaliges Spülen der Säule mit MACS-Puffer wurden alle restlichen nicht markierten Zellen zusätzlich noch ausgewaschen. Mit einem Stempel können dann alle markierten Zellen außerhalb des Magneten aus der Matrix der Säule gedrückt werden. Sowohl die markierte als auch die unmarkierte Zellfraktion lässt sich anschließend in Kultur nehmen, wobei hier ausschließlich die unmarkierten T-Zellen weiter verwendet wurden. Die so gewonnenen T-Zellen waren eine Mischung aus allen T-Zell-Subpopulationen und werden als pan-T-Zellen bezeichnet.

Für die Isolation von ungeprägten (*naiven*) T-Zellen und von T-Gedächtniszellen (*memory T-Zellen*) wurde ebenfalls die magnetische Aufreinigung mittels der negativen Selektion gewählt. Naive T-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche die Isoform CD45RA von CD45, wohingegen T-Gedächtniszellen die Isoform CD45R0 besitzen.

Bei der negativen Selektion von ungeprägten T-Zellen wurden dementsprechend beim zweiten Markierungsschritt zusätzlich noch CD45R0-MicroBeads zu den Anti-Hapten-Antikörpern hinzugefügt. Für die negative Selektion von T-Gedächtniszellen wurden CD45RA-MicroBeads eingesetzt.

2.1.1.10. Kokultur von dendritischen Zellen mit autologen T-Zellen

Um *in vitro* Antigen-spezifische T-Zellen zu induzieren, wurden die T-Zellen über eine gewisse Zeit mit autologen Antigen präsentierenden dendritischen Zellen in Kokultur gebracht. Das Verhältnis der DCs zu T-Zellen betrug in der Kokultur 1:10. Die Kokultur von gereinigten T-Zellen und dendritischen Zellen wurde in 12-Loch Platten mit je 3 ml Volumen angelegt. Zur Optimierung des gewünschten Antigen-spezifischen T-Zell-Wachstums wurde die Kokultur mit 25 IU/ml Interleukin-2 (IL-2) und 10 ng/ml Interleukin-7 (IL-7) angereichert.

Bei einem Versuchsprotokoll mit vier Spendern wurde eine Kokultur von pan-T-Zellen und Melan-A-beladenen moDC bzw. *FastDCs* angesetzt. Diese wurde zweimal im wöchentlichen Abstand mit frisch generierten Antigen-beladenen DCs restimuliert. Insgesamt wurden die T-Zellen mit dem gewünschten Antigen dreimal konfrontiert. Als Kontrolle dienten Kokulturen, die stets mit unbeladenen DCs restimuliert wurden und Kokulturen, bei denen die erste Restimulation mit Melan-A-beladenen DCs, die zweite Restimulation jedoch mit HIV-Pol-beladenen DCs erfolgte. Jeden zweiten Tag wurde die Hälfte des Mediums abgenommen und durch dieselbe Menge an frischem DC-Medium mit gleicher Konzentration IL-2 und IL-7 ersetzt. Die Überstände der Kokulturen wurden 48 Stunden nach Ansetzen und 48 Stunden nach Restimulation mit frischen DCs entnommen und bei -20°C für spätere Zytokinmessungen eingefroren.

In zwei anderen Versuchsanordnungen mit je vier Spendern wurden Kokulturen mit Tetanustoxoid-beladenen *FastDCs* und autologen naiven T-Zellen bzw. pan-T-Zellen angesetzt. Als Kontrollen dienten Kokulturen mit unbeladenen DCs. Diese Kulturen wurden nur über eine Woche aufrechterhalten.

2.1.1.11. Kultivierung der T2-Zellen

Die lytische Spezifität der CTLs wurde mit so genannten T2-Zellen überprüft. T2-Zellen sind Tumorzellen, die keinen *transport associated with antigen processing* (TAP) besit-

zen. Dieser ist notwendig, um die im Zytosol durch das Proteasom entstandenen Peptide in das endoplasmatische Retikulum (ER) zu transportieren, wo der Zusammenbau des Peptids mit dem MHC-I-Molekül stattfindet. Dieser Komplex wird anschließend über den Golgi-Apparat in exozytotischen Vesikeln an die Zelloberfläche transportiert. Die MHC-I-Moleküle der T2-Zellen enthalten keine endogenen Peptide und können deshalb von außen mit den gewünschten Peptiden effizient beladen werden. Die Züchtung der T2-Zellen erfolgte in 250 ml Kulturflaschen mit T2-Zell-Medium. Sie wurden regelmäßig lichtmikroskopisch auf Anzeichen von mikrobieller Verunreinigung und Zelluntergang kontrolliert. Ein- bis zweimal wöchentlich, dem Wachstum der Zellen angepasst, wurden die Zellen aus den Flaschen geerntet und zentrifugiert. Anschließend wurde ungefähr ein Drittel der Zellen mit frischem Medium auf je eine neue Flasche verteilt. Eine mögliche Kontamination mit Mykoplasmen wurde durch das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Dienststelle Oberschleißheim, ausgeschlossen.

2.1.2. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie mittels eines *Fluorescence-activated cell sorters* (FACS) ermöglicht es, Zellen anhand ihres Phänotyps zu unterscheiden und zu quantifizieren. Mit dieser Methode wurden Zellpopulationen auf Reinheit, Vitalität, Oberflächenantigene und intrazelluläre Moleküle untersucht. Sie diente auch zur Charakterisierung spezifischer T-Zell-Rezeptoren.

2.1.2.1. Allgemeines Funktionsprinzip

Die zu untersuchenden Zellen werden mit fluoreszierenden Antikörpern gegen ein gewünschtes Oberflächenantigen markiert und in einem laminaren Flüssigkeitsstrom hintereinander einzeln durch einen Laserstrahl geführt. Zelleigenschaften wie Größe, Form, Membranoberfläche und intrazelluläre granuläre Bestandteile führen zu einer Lichtstreuung, die von je einer Linse in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (Vorwärtstreulicht) und einer rechtwinklig dazu angebrachten (Seitwärtstreulicht) gesammelt und photometrisch detektiert wird. Das Vorwärtstreulicht wird wesentlich durch die Zellgröße, das Seitwärtstreulicht durch die intrazelluläre Granularität bestimmt. Die gewünschte Zellpopulation kann anhand dieser Kriterien ausgewählt und weiter auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht werden.

Das Chromophor an den für die Oberflächenmarkierung verwendeten Antikörpern wird durch den Laserstrahl zur Emission von Lichtquanten angeregt, die durch eine Linse gesammelt werden. Filter trennen das gesammelte Licht nach Wellenlängenbereichen und lenken es zu unterschiedlichen Detektoren. So können die Signale mehrerer verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe getrennt aufgenommen und quantitativ ausgewertet werden. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Anzahl der pro Zelle gebundenen Antikörper und damit zur Anzahl der untersuchten Oberflächenmoleküle.

Bei der direkten Immunfluoreszenz werden Fluorochrom-gekoppelte Antikörper verwendet, die direkt an Oberflächenmoleküle binden. Bei dem Verfahren der indirekten Immunfluoreszenz werden die Zellen in einem ersten Schritt mit einem unmarkierten Antikörper inkubiert und erst in einem zweiten Schritt mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gefärbt, der gegen den F_c -Teil des ersten Antikörper gerichtet ist.

Die Auftrennung der verschiedenen Fluoreszenzfarben durch die Lichtfilter gelingt nicht vollständig, da sich die Spektren der eingesetzten Farbstoffe zum Teil überlappen. Diese Überlappung wird durch Kompensation korrigiert, indem von jedem registrierten Fluoreszenzsignal der Anteil abgezogen wird, der durch Überlappung entsteht. Hierzu werden bei jedem Versuch Kontrollproben hergestellt, bei denen jeweils nur eine Eigenschaft mit einem bestimmten Fluorochrom angefärbt ist, während die anderen Fluorochrome, gebunden an geeignete Isotypen-Antikörper, als Negativkontrolle dienen. Hierbei wird sichtbar, wie stark ein bestimmtes Fluorochrom in die anderen Kanäle hineinstrahlt, was die Kompensation ermöglicht. Ebenso kann mit Hilfe der Isotypen die Signalverstärkung der einzelnen Kanäle so justiert werden, dass sich Zellen mit entsprechenden Antigenen bzw. Eigenschaften qualitativ und quantitativ unterscheiden und vergleichen lassen.

Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und die dazugehörigen maximalen Emissions- und Exzitations-Wellenlängen:

Fluoreszenzfarbstoff	Exzitation	Emission
Fluorescein-Isocyanat (FITC)	495 nm	525 nm
Phycoerithrin (PE)	565 nm	578 nm
Allophycocyanin (apc)	650 nm	660 nm
Peridinin-Chlorophyll-A-Protein (PerCP)	488 nm	680 nm
Alexa Fluor 488	488 nm	519 nm

2.1.2.2. Bestimmung der Reinheit und des Überlebens

Monozyten beziehungsweise dendritische Zellen wurden morphologisch von anderen PBMCs durch die so genannte *Life-gate*-Analyse unterschieden. Die Zellen wurden durchflusszytometrisch auf Größe und Granularität untersucht, wodurch Monozyten und dendritische Zellen eindeutig charakterisiert und von Lymphozyten, Erythrozyten, toten Zellen und Zellfragmenten unterschieden werden können.

Durch die Berechnung der einzelnen Fraktionen ist es möglich, das Überleben und die Reinheit der dendritischen Zellen in Bezug auf die restlichen PBMCs zu bestimmen.

2.1.2.3. Bestimmung der Oberflächenmarker

Phänotypisch konnten die Zellen mittels der FACS-Methode hinsichtlich der Expression ihrer Oberflächenantigene untersucht werden.

Dafür wurden etwa 1×10^5 – 5×10^5 Zellen in einem FACS-Röhrchen zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 200 μ l (PBS + FCS 3 Vol%) resuspendiert. Zur Färbung wurden die Zellen für 15-30 Minuten bei 4°C unter Lichtausschluss mit FITC-, PE-, PerCP- oder apc-gekoppelten Antikörpern inkubiert (direkte Fluoreszenz) und anschließend mit PBS gewaschen.

Für die Untersuchung des Chemokinrezeptors 7 (CCR-7) wurde eine indirekte dreifache Färbung benutzt. Zuerst wurden die Zellen mit einem für CCR-7 spezifischen nicht gefärbten Ratten-Antikörper markiert. Im zweiten Schritt wurde ein mit Biotin gekoppelter Anti-Ratte Antikörper hinzugegeben, der an den ersten bindet. Durch die Zugabe eines fluoreszierenden Streptavidin-apc Konjugats, welches an Biotin bindet, wurde die Färbung vervollständigt.

Die Fluoreszenzintensität wurde mit einem FACSCalibur gemessen und anschließend mit Hilfe der Cell Quest Software analysiert.

2.1.2.4. Analyse intrazellulärer Zytokine

Zur durchflusszytometrischen Analyse des intrazellulären Moleküls IFN- γ ist es nötig die Zellwand durchlässig zu machen, damit die Antikörper gegen intrazelluläres IFN- γ ins Zellinnere gelangen können. Durch die vorherige Fixierung der Zellen wurde die Zellintegrität während dieses Vorgangs erhalten.

Als erstes wurden die zu färbenden Zellen mit Brefeldin-A (1 µg/ml) für vier Stunden im Brutschrank inkubiert, damit die produzierten Zytokine die Zelle nicht mehr verlassen können. Nach Ablauf der Inkubation wurde zur Charakterisierung der Zellen ein Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper für das Oberflächenantigen CD8 zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, zentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt. Mit 100 µl Paraformaldehyd (Lösung A, *Fix & Perm-Reagenz*) für 15 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen fixiert und anschließend mit PBS zweimal gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen in 100 µl saponinhaltiger Lösung (Lösung B, *Fix & Perm-Reagenz*) 15 min bei Raumtemperatur suspendiert und der entsprechende Antikörper für die intrazelluläre Messung von IFN- γ hinzugefügt. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS wurde die Analyse der Zellen dann, wie oben beschrieben, durchgeführt.

2.1.2.5. Identifizierung HLA-A2 positiver Zellspender

Für die Beladung der DCs mit Melan-A oder HIV-Pol wurden HLA-A2 positive Spender benötigt, da beide Peptide HLA-A2 restringiert sind. PBMCs freiwilliger Blutspender wurden durchflusszytometrisch mit einem an Fluoreszenz-gekoppelten spezifischen Antikörper gegen das Oberflächenmolekül HLA-A2 typisiert. Als Kontrolle dienten PBMCs von Spendern mit bekanntem HLA-A2 Typus.

2.1.2.6. Polymere MHC-I-Moleküle

Mit Hilfe von polymeren MHC-I-Molekülen ist es möglich, die Antigen-spezifität von T-Zell-Rezeptoren mit der FACS-Methode zu analysieren [Altman, 1996]. Lösliche, an Biotin gekoppelte, MHC-I-Moleküle werden mit Epitopen bekannter Aminosäuresequenz beladen und jeweils acht bis zwölf dieser Gebilde an ein Fluoreszenz-markiertes Streptavidin gebunden, wodurch ein polymerer MHC-I-Peptid-Komplex entsteht. Durch die stabile Bindung an die Polymere lässt sich die T-Zell-Subpopulation mit Antigen-spezifischen Rezeptoren von den restlichen abgrenzen. Zusätzliche Färbung mit anderen Oberflächenantikörpern lässt eine genauere Charakterisierung dieser spezifischen T-Zellen zu.

Im ersten Schritt wurden Melan-A tragende MHC-I-Moleküle mit Strep-Tactin®-PE und PBS+0,5% BSA für 45 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Zwischenzeitlich wurden

die T-Zellen zentrifugiert und der Überstand vollständig dekantiert. Sie wurden danach in 50 μ l des hergestellten Streptamergemisches aufgenommen und unter eben genannten Bedingungen weitere 45 min inkubiert. 15 bis 20 Minuten vor Ablauf dieser Zeit wurden zusätzlich konventionelle Oberflächenantikörper hinzugegeben. Nach zwei- bis dreimaligem Waschen wurden die gefärbten Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

2.1.3. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Die Zytokine IL-4, IL-12, IL-18, IFN- γ und IL-10 im Überstand der unterschiedlichen Zellkulturen wurden mit einem ultrasensitiven ELISA bestimmt.

Am Abend vor der Messung wurden die Vertiefungen einer 96-Loch Platte mit einem Protein-spezifischen Antikörper (*Capture-Antibody*) beschichtet, der fest an der Plastikoberfläche bindet. Mit einer Plastikfolie abgedeckt wurde die Platte über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Tags darauf wurden zellfreie Kultur-Überstände abgenommen, bei Bedarf entsprechend mit *assay diluent* verdünnt, und davon Proben in die beschichteten Vertiefungen pipettiert. Zusätzlich wurde eine titrierte Standardreihe mit genau bekannter Proteinkonzentration hergestellt und auf die Platte aufgetragen. Nach einer zweistündigen Inkubationszeit ist das vorhandene Protein an die Antikörper gebunden. Es folgten drei Waschschriffe bevor ein zweiter biotinylierter Antikörper hinzugegeben wurde, der an ein anderes Epitop des schon gebundenen Proteins bindet. Nach 30 Minuten folgte ein weiterer Waschschriff und anschließend wurde ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat hinzugefügt, welches an Biotin bindet. Durch Ausbildung mehrerer Biotin-Streptavidin Brücken pro Antikörper wird eine Signalverstärkung und somit eine höhere Sensitivität erreicht. Überschüssiges Konjugat wurde durch einen weiteren Waschschriff entfernt. Die Peroxidase katalysiert mit einem anschließend zugegebenen Farbstoff eine quantifizierbare Reaktion. Die Farbintensität kann mittels eines ELISA-Readers abgelesen werden. Sie ist proportional der Proteinkonzentration, die mit der Standardreihe quantifiziert werden kann.

2.1.4. Enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT)

Im Gegensatz zum ELISA, mit dem die Konzentration von Zytokinen im zellfreien Überstand bestimmt wird, werden im ELISPOT die Zytokin sezernierenden Zellen selbst

erfasst. Dadurch wird eine Aussage über die Anzahl der Zytokin produzierenden Zellen möglich. Eine Membran wird mit Antikörpern gegen das fragliche Zytokin beschichtet und dann werden die Zellen aufgebracht. Das von einer Zelle sezernierte Zytokin bindet unmittelbar außerhalb der Zelle an den Antikörper. Nach Abwaschen der Zellen kann dann an den Stellen, an denen sich eine Zytokin sezernierende Zelle befunden hat, das Antikörper-gebundene Zytokin als Farbpunkt (*spot*) dargestellt werden. Jeder *spot* entspricht somit jeweils einer Zytokin sezernierenden Zelle.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode nur zur Bestimmung von IFN- γ produzierenden T-Zellen eingesetzt. Als erstes wurden für den ELISPOT vorgesehene 96-Loch Nitrozellulose-Platten mit Antikörper gegen IFN- γ beschichtet (*Capture-Antibody*, 100 μ l/Vertiefung), mit einem Deckel abgedeckt und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit ELISPOT-Waschpuffer (siehe 2.3.7.1.) entfernt. Anschließend erfolgte eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur mit ELISPOT-Block-Puffer (200 μ l/Vertiefung). Nach dreimaligem Waschen wurden die Vertiefungen mit je 200 μ l DC-Medium gefüllt, welches bis zur Beladung mit Zellen die Vertiefungen anfeuchtete.

Die zu untersuchenden T-Zellen wurden separat im Verhältnis 10:1 mit Antigen beladenen DCs angesetzt und je 100 μ l dieser Suspension in Triplikaten auf die Platte aufgebracht. Die eingesetzte Zahl variierte zwischen 6,25–50 $\times 10^3$ T-Zellen pro Vertiefung. Die Platte wurde mit Alufolie umhüllt für 18 Stunden im Brutschrank inkubiert [Kalyuzhny und Stark, 2001]. Nachdem das von den T-Zellen produzierte IFN- γ an die Antikörper gebunden war, konnten die Zellen durch viermaliges Waschen von den auf der Platte gebundenen Zytokinen entfernt werden. Ein zweiter, biotinylierter, gegen IFN- γ gerichteter Antikörper (*Detection-Antibody*, 100 μ l) wurde in die Vertiefungen pipettiert und die Platte über Nacht bei 4° aufbewahrt. Nach dreimaligem Waschen am nächsten Tag wurden die Vertiefungen mit je 100 μ l Streptavidin-Alkalischer-Phosphatase, welche an Biotin bindet, für zwei Stunden bei Raumtemperatur kultiviert. Nochmals wurde dreimal gewaschen bevor letztlich 100 μ l eines Substrates (BCIP/NBT-Chromogen) pro Vertiefung zugegeben wurden, wodurch die Interaktion der alkalischen Phosphatase mit dem Reagenz eine Farbreaktion auslöst. Unter Lichtausschluss wurden die Platten 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Reaktion durch destilliertes Wasser gestoppt wurde. Nach vollständigem Trocknen der Plattenmembranen wurden die Ergebnisse mit Hilfe eines Lichtmikroskops, das über eine Videokamera an einen Computer angeschlossen war, mit dem Computerprogramm KS-

ELISPOT ausgewertet. In einzelnen Fällen wurden die Ereignisse unter dem Lichtmikroskop von Hand ausgezählt.

2.1.5. [³H]-Thymidin Proliferationstest

Inwieweit DCs autologe und allogene Lymphozyten zur Proliferation anregen können, wurde mit dem [³H]-Thymidin Proliferationstest untersucht. Hierbei wird den zu untersuchenden Lymphozyten mit Tritium markiertes Thymidin angeboten. Dieses integrieren die Lymphozyten bei ihrer DNA-Synthese in gleicher Menge in die neu gebildete DNA wie das unmarkierte physiologische Analogon. Der Einbau ist abhängig von der DNA-Syntheserate und damit ein Maß für die Proliferation. Der Vorteil im Vergleich zu anderen Methoden besteht darin, dass durch die Messung der DNA-Synthese die Proliferation in einem sehr frühen Stadium gemessen wird, in dem sich die Zellen noch nicht vollständig dupliziert haben müssen.

Frisch generierte dendritische Zellen wurden auf eine Konzentration von 10^5 /ml und nicht-adhärenente Zellen (=NAZ: B-Zellen, NK-Zellen, pan-T-Zellen) auf 2×10^6 /ml eingestellt. In eine 96-Loch Platte wurde mit jeweils 200 μ l Gesamtvolumen pro Vertiefung ein Gemisch aus beiden Zellen aufgebracht. Dabei wurden die beiden Zellpopulationen so gemischt, dass es den Verhältnissen DC/NAZ von 1:20–1:320 entsprach. Es wurden Quadruplikate jeder einzelnen Bedingung angefertigt, aus denen später der Mittelwert errechnet wurde. Als Kontrolle dienten NAZ, die ohne DC-Stimulus nur in Medium kultiviert wurden. Für 5 Tage wurden die Platten im Brutschrank inkubiert und anschließend mit 1 μ Ci/Vertiefung [³H]-Thymidin für weitere 18 Stunden im Brutschrank kultiviert. In der Zeit konnten die nicht-adhärenenten Zellen das markierte Thymidin in ihre DNA einbauen. Der Einbau von [³H]-Thymidin in die DCs konnte ausgeschlossen werden, da diese vollständig differenzierte Zellen sind und deshalb nicht mehr proliferieren. Nach den 18 Stunden wurden die Zellkulturen mit einem *Micro 96l Harvester* geerntet, auf Filter transferiert, von überschüssigem Thymidin befreit und dann über mehrere Stunden getrocknet. Anschließend wurden sie in Plastiktüten eingeschweißt und mit Szintillationsflüssigkeit imprägniert. Die radioaktive Strahlung der Zellen wurde in einem Szintillationszähler in *counts per minute* (cpm) gemessen. Anhand der gemessenen cpm war somit eine Quantifizierung und ein Vergleich der Proliferationsrate der Lymphozyten möglich.

2.1.6. Zellvermittelter Zytotoxizitätstest

Der ^{51}Cr -Lyse-Test ist eine quantitative Methode, mit der die Aktivität von Effektorzellen, wie beispielsweise zytotoxische T-Zellen, gegenüber Zielzellen ermittelt werden kann. Dafür werden Zielzellen, hier T2-Zellen, mit ^{51}Cr Chromat $^{6+}$ inkubiert, wobei die Zielzellen das ^{51}Cr Chromat $^{6+}$ aufnehmen und zu ^{51}Cr Chromat $^{3+}$ reduzieren. Das reduzierte ^{51}Cr Chromat $^{3+}$ wird nur in geringem Maße abgegeben und kann von anderen Zellen nicht aufgenommen werden. Bei der Koinkubation von CTLs als Effektor- und T2-Zellen als Zielzellen wird das ^{51}Cr bei der Zytolyse von den Zielzellen in das umgebende Medium abgegeben und kann in diesem mit einem γ -Zähler gemessen werden. Die Menge des freigesetzten ^{51}Cr Chroms ist proportional der Menge der lysierten Zielzellen und lässt dadurch einen Rückschluss auf die zytotoxische Aktivität der Effektorzellen zu.

Zur Durchführung des Tests wurden die T2-Zellen zuerst für vier Stunden mit den Peptiden Melan-A oder Pol beladen, geerntet, zentrifugiert, in 100 μl reinem AB-Serum aufgenommen und eine Stunde bei 37°C mit $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (100 μCi pro $1\text{-}2 \times 10^6$ Zellen) unter gelegentlichem Aufschütteln inkubiert. Nach viermaligem Waschen wurden je 5×10^3 T2-Zellen in den Vertiefungen einer 96-Loch Platte mit gewaschenen CTLs gemischt. Es wurden jeweils Triplikate angefertigt. Das Gesamtvolumen jeder Vertiefung betrug 200 μl und das Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen (E/T Verhältnis) wurde von 80:1 auf 20:1 herunter titriert. Nach vier Stunden Inkubation bei 37°C wurden jeweils 50 μl Überstand pro Ansatz entnommen, in Kunststoffröhrchen übertragen und in einem γ -Zähler (γ -Counter) die radioaktiven Zerfälle über eine Minute gemessen.

Für beide unterschiedlich beladenen T2-Zellen wurde die Spontanfreisetzung von ^{51}Cr durch alleinige Inkubation der Zielzellen mit Medium und die Maximalfreisetzung durch Zugabe des Detergenz Triton-X (1%) bestimmt.

Die Auswertung erfolgte computergestützt mittels einer Microsoft-Excel Tabellen Kalkulation. Dabei wurde die Stärke der Zytotoxizität der Effektorzellen in Prozent spezifischer Lyse angegeben. Die spezifische Lyse wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{\text{Experimentelle } ^{51}\text{Cr-Freisetzung [cpm]} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung [cpm]}}{\text{Maximale } ^{51}\text{Cr-Freisetzung [cpm]} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung [cpm]}}$$

2.2. Molekularbiologische Methoden

Die Zytokinproduktion der *FastDCs* wurde nicht nur auf Proteinebene sondern auch auf der Ebene der messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) untersucht.

2.2.1. Isolation zytoplasmatischer Ribonukleinsäure

Zur Extraktion zytoplasmatischer Ribonukleinsäure (RNA) (n=8) wurde eine gleiche Zahl *FastDCs*, die mit oder ohne IFN- α generiert worden waren, in 200 μ l PBS gelöst. Durch Zugabe von 400 μ l eines Lyse-/Bindepuffers wurden die Zellen lysiert und zugleich die RNAasen inaktiviert. Anschließend wurden die Proben auf eine Säule mit einem Glasvlies gegeben und bei 8000 g für 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchlauf konnte danach verworfen werden, da die Nukleinsäuren im Vlies hängen geblieben waren. Die verbliebene Desoxyribonukleinsäure (DNA) wurde durch Zugabe von 100 μ l DNAase-Lösung in 15 Minuten bei Raumtemperatur verdaut. Die verdaut DNA und restliche DNAase-Lösung konnten durch drei Waschschriffe aus dem Vlies entfernt werden. Nach Zugabe von 500 μ l Waschpuffer I und Zentrifugation bei 8000 g für 15 Sekunden erfolgte die Zugabe von 500 μ l Waschpuffer II und nochmalige Zentrifugation für 15 Sekunden bei 8000 g. Am Ende wurde ein letzter Zentrifugationsschritt mit 200 μ l Waschpuffer II für 2 Minuten bei 13000 g durchgeführt. Die RNA konnte dann mit 50 μ l Eluationspuffer und einer Zentrifugation von 1 Minute bei 8000 g aus dem Vlies herausgelöst werden. Die extrahierte RNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.2.2. Reverse Transkription

Damit die RNA in der PCR (Polymerase-Kettenreaktion) amplifiziert werden konnte, musste sie zuerst revers transkribiert und in einen *copyDNA* (cDNA)-Einzelstrang umgeschrieben werden. Hierzu wurde der *First-Strand cDNA Synthesis kit* von Roche verwendet. Der Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Reagenzien mit der angegebenen Endkonzentration zusammen: 10 mM Tris, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM Deoxynucleotide Mix, 0,04 A₂₆₀ U Oligo-p(dT)15 Primer, 50 U RNAase Inhibitor und 20 U *AMV Reverse Transkriptase*. 16,4 μ l der gewonnenen RNA aus den *FastDCs* wurden mit 23,6 μ l des *First-Strand* Reaktionsmixes für zehn Minuten bei 25°C inkubiert und anschließend für 60 min auf 42°C erhitzt. Zur Vermeidung einer späteren Interfe-

renz der *AMV Reversen Transkriptase* und der PCR, wurde der Reaktionsansatz am Ende für 5 min auf 99°C erhitzt um die *AMV* zu denaturieren. Als letztes folgte noch eine fünfminütige Abkühlung auf 4°C.

2.2.3. Polymerase-Kettenreaktion

2.2.3.1. Allgemeines Funktionsprinzip

Mit dem Verfahren der PCR ist es möglich, ein spezifisches DNA-Stück aus einem komplexen Nukleinsäuregemisch wie genomische DNA, Plasmid-DNA oder cDNA zu amplifizieren. Diese spezifische, zu amplifizierende DNA-Matrize wird hierbei auch als *template* bezeichnet. Die Reaktion erfolgt mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase, der Taq-Polymerase, und einem sequenzspezifischen Oligonukleotid-Primerpaar, das den Enden des *templates* homolog ist. Bei der Reaktion werden folgende drei Schritte durchlaufen: 1. Denaturierung und bei doppelsträngiger DNA Aufschmelzen der beiden Stränge der Matrizen-DNA (Denaturierung), 2. Spezifische Hybridisierung der Primer an die homologe Zielsequenz auf der DNA (Anlagerung) und 3. Von den Primern ausgehende DNA-Synthese (Elongation). Das so synthetisierte DNA-Fragment dient in der darauf folgenden Amplifikationsrunde als Matrize für den anderen Primer. Dadurch ist in mehreren aufeinander folgenden Zyklen eine exponentielle Anreicherung einer beliebigen DNA-Sequenz, die zwischen den beiden Primern liegt, möglich. Wenn es sich bei der Vorlage, dem *template*, der zu amplifizierenden Sequenz um ein Stück RNA handelt, die zuvor in cDNA umgeschrieben wurde, spricht man auch von der Reversen-Transkription-PCR (RT-PCR).

2.2.3.2. Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis bestimmter Zytokine in den *FastDCs*

Für die Amplifikation der mRNA von IL-12(p35), IL-18, IL-12(p19) und β -Aktin wurden folgende Primer-Oligonukleotide verwendet (Applied Biosystems, Norwalk, CT).

mRNA		Sequenz (5' → 3')	Referenz
IL-18	Vorwärts	GCTTGAATCTAAATTATCAGTC	[Takahata, 2001]
	Rückwärts	GAAGATTCAAATTGCATCTTAT	
IL-12(p35)	Vorwärts	CGGACCGGAGGTCTTTCTGG	[Song, 2000]
	Rückwärts	CCTCAGTTTGGCCAGAAACC	
IL-12(p19)	Vorwärts	AGCAGCTCAAGGATGGCACTCAG	[Wesa und Galy, 2002]
	Rückwärts	CCCCAAATTTCCCTTCCCATCTA	
β-Actin	Vorwärts	TGCCCTGAGGCACTCTTCCA	[Kaminski, 1996]
	Rückwärts	TTGCGCTCAGGAGGAGCAAT	

Die lyophilisierten Primerpaare wurden in 1 ml Aqua dest. aufgenommen, in kleine Portionen aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Zur Durchführung der PCR wurde ein Gemisch von 50 µl Gesamtvolumen für jede Probe angefertigt, das sich wie folgt zusammensetzte: 40,75 µl Aqua dest., 5 µl PCR-Puffer (10-fach konzentriert), 1 µl dNTP, 1 µl Vorwärts- und 1 µl Rückwärts-Primer, 0,25 µl Taq-Polymerase und 1 µl cDNA-*template*.

Die Proben wurden in kleine Plastikgefäße pipettiert, gemischt, vorsichtig kurz zentrifugiert, so dass keine Reste am Röhrchenrand verblieben und in den Thermocycler gestellt, um die Reaktion zu starten. Die Kammern des Thermocyclers wurden für 5 min mit 95°C vorgeheizt, damit es zur vollständigen Denaturierung des *templates* kam. Für die Amplifikation der verschiedenen mRNAs wurden dann verschiedene Zykluszahlen und Temperaturen gewählt, damit die Unterschiede später bei der gelelektrophoretischen Auftrennung besser sichtbar waren. β-Actin-mRNA wurde mit 25 aufeinander folgenden Zyklen von einer Minute bei 95°, einer Minute bei 60°C und einer Minute bei 72°C amplifiziert. Mit IL-18-mRNA wurde genauso vorgegangen, allerdings waren es hier 30 Zyklen. Die Amplifikation von IL-12(p19)-mRNA fand in 30 Zyklen von je einer Minute bei 95°, einer Minute bei 56°C und einer Minute bei 72°C statt und die von IL-12(p35)-mRNA in 35 Zyklen von je einer Minute bei 95°, einer Minute bei 62°C und einer Minute bei 72°C. Am Ende jeder vollständig abgelaufenen RT-PCR folgte noch eine letzte Phase von einmalig fünf Minuten bei 72°C, damit die Taq-Polymerase genug Zeit hatte, jeden Strang vollständig zu Ende zu synthetisieren.

2.2.4. Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der DNA-Fragmente wurde ein 1,5 %iges Agarosegel hergestellt. Dafür wurden 1,95 g Agarose in 130 ml TBE-Puffer gelöst und zum Kochen gebracht, so dass eine klare Flüssigkeit entstand. Danach wurden 5 µl Ethidiumbromid untergerührt und das Gemisch in eine vorgefertigte Gelwanne gegossen und bei Raumtemperatur 1 Stunde lang ausgekühlt. Nach Einbringen in die Elektrophoresekammer wurde das Gel mit TBE-Puffer überschichtet und der Kamm aus dem Gel entfernt. In die Gel-taschen wurden 20 µl der PCR-Produkte und 4 µl eines 6-fach konzentrierten Ladepuffers gefüllt. Der Ladepuffer enthielt einen blauen Farbstoff, der das Einbringen in die Taschen erleichterte, und Glycerin, welches durch seine höhere Dichte das Absinken des Gemisches auf den Taschenboden zur Folge hatte. Ein elektrisches Feld mit einer festen Spannung von 80 Volt und einer variablen Stromstärke wurde angelegt, so dass sich die DNA-Fragmente auftrennten. Da Ethidiumbromid in die Nukleotidstränge interkaliert, war eine Kontrolle der Fragmentauftrennung unter UV-Licht (366 nm) möglich. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele unter UV-Licht mit einer Polaroidsofortbildkamera fotografiert.

2.3. Reagenzien, Chemikalien und Geräte

2.3.1. Geräte

Gerät	Name	Firma
96 Well Harvester	Micro 96 Harvester	Skatron Instruments (Ismaning, D)
Begasungsbrutschrank	BBD 6220	Heraeus (Hanau, D)
Durchflusszytometer	FACSCalibur	Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
Eismaschine	-	Ziegra (Isernhagen, D)
Elektrophoresekammer		Bio-Rad (München, D)
ELISA-Reader	MRX	Dynatech-Laboratories (Guernsey, GB)
ELISPOT Mikroskop	Axioplan2	Carl Zeiss (Jena, D)
ELISPOT Programm	KS-ELISPOT	Zeiss (Göttingen, D)

ELISPOT Videokamera	3CCD Color Video Camera	Sony (Köln, D)
Filme	Polaroid geeignet	Dinkel (München, D)
Sterilbank	LaminAir® (HB 2472 S)	Heraeus (Hanau, D)
Fotoapparat	MP-4 Land Camera	Polaroid (Offenbach, D)
MACS-Gerät	MidiMACS	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Phasenkontrastmikroskop	Axiovert 25	Carl Zeiss (Jena, D)
pH-Meter	pH 330	WTW (Weilheim, D)
Pipetierhilfe	Pipetus®	Hirschmann® (Eberstadt, D)
Thermocycler	T3-Thermocycler	Biometra (Göttingen, D)
Tischzentrifuge	-	National Labnet Co (Woodbridge, NJ, USA)
UV-Lichttisch	2011 Macrovue Transilluminator	LKB Gromma
Vortexer	VF 2	Janke & Kunkel GmbH (Staufen, D)
Waage	SBC 21	Scaltec Instruments GmbH (Heiligenstadt, D)
Zentrifuge	Omnifuge 2 0RS	Heraeus (Hanau, D)
Zentrifuge	Centrifuge 5417 R	Eppendorf (Hamburg, D)
β-Counter	1205 Betaplate Liquid Scintillation Beta Counter	Wallac Oy (Turku, FL)
γ-Counter	1480 Wizard 3_Gamma Counter	Wallac Oy (Turku, FL)

2.3.2. Chemikalien

Name	Firma
Agarose	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
BD PharM Lyse™ Erythrozyten Lyse-Reagenz	Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
Betaplate Scint	Perkin Elmer (Boston, MA, USA)
Brefeldin A	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Ethanol	Merck (Darmstadt, D)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

FACSClean	Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
FACSFlow™	Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
FACSRinse	Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
Heparin-Natrium	Braun (Melsungen, D)
Sucrose	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Triton-X	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Tween® 20	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

2.3.3. Radioaktive Chemikalien

Name	Firma
[³ H]-Thymidin (1 μCi/20 μl)	Amersham (Freiburg, D)
⁵¹ Chrom [Na ₂ ⁵¹ CrO ₄] (1 mCi/ml)	PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA, USA)

2.3.4. Reagenziensätze

Zellisolation mittels der MACS-Methode

Name	Firma
CD45RA MicroBeads, Human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD45RO MicroBeads, Human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Pan T Cell Isolation Kit, Human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)

Bestimmung von Zytokinen mittels ELISA und ELISPOT

Name	Firma
ELISPOT Blue Colour Module	R&D Systems (Wiesbaden, D)
Human IFN-γ Development Module (ELISPOT)	R&D Systems (Wiesbaden, D)
Human IFN-γ ELISA	Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
Human IL-10 ELISA	Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
Human IL-12p40 ELISA	Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
Human IL-12p40/p70 ELISA	Bender Med Systems (Wien, A)
Human IL-12p70 ELISA; high sensitive	R&D Systems (Wiesbaden, D)

Human IL-18 ELISA	Bender MedSystems (Wien, A)
Human IL-4 ELISA	Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)

Bestimmung von intrazellulären Zytokinen mittels der Durchflusszytometrie

Name	Firma
Fix & Perm	Caltag (Kaumberg, A)

Isolation von RNA, Herstellung von cDNA und PCR Utensilien

Name	Firma
dNTP	Promega (Madison, WI, USA)
First strand cDNA synthesis kit	Roche (Mannheim, D)
High pure isolation kit	Roche (Mannheim, D)
PCR-Puffer (10x)	Roche (Mannheim, D)
Taq-Polymerase	Roche (Mannheim, D)

2.3.5. Materialien für die Zellkultur

Plastikmaterialien

Name	Firma
10 ml Röhrchen (<i>Red cap</i>)	Sarstedt (Nümbrecht, D)
1 ml Spritzen	BD Labware (Millville, NJ, USA)
200 µl Röhrchen	Biozym (Hamburg, D)
5-/10-/50-ml Pipetten	Bibby Sterilin LTD (Staffordshire, GB)
50 ml Perfusor Spritzen	BD Labware (Millville, NJ, USA)
550, 250 ml Kulturflaschen	Greiner (Frickenhausen, D)
6-/12-/24-/48-/96-Loch Flachboden Zellkulturplatten	Falcon BD Labware (Millville, NJ, USA)
96-Loch Rundboden-Platten	Falcon BD Labware (Millville, NJ, USA)
Eppendorf-Gefäße	Eppendorf (Hamburg, D)
FACS-Röhrchen	Falcon BD Labware (Millville, NJ, USA)
MACS Separation Columns LS	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Millititer-ELISPOT-Kulturplatten	Millipore (Bedford, MA, USA)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht, D)

Polypropylen Röhrchen (50ml) (<i>blue cap</i>)	Greiner (Frickenhausen, D)
Printed Filtermat A	Wallac Oy (Turku, FL)
Sample Bag for use with 1205 Betaplate	Wallac Oy (Turku, FL)
Sterile FACS-Röhrchen	Falcon BD Labware (Millville, NJ, USA)
Sterile Nadeln gelb	BD Labware (Millville, NJ, USA)
Sterilfilter 40 μm	Falcon BD Labware (Millville, NJ, USA)
Sterilfilter MACS	Falcon BD Labware (Millville, NJ, USA)
Zellschaber	Sarstedt (Nümbrecht, D)

Lösungen

Name	Firma
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Ficoll Hypaque	Biochrom (Berlin, D)
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco-Invitrogen (Paisley, GB)
Humanes AB-Serum	BioWhittaker (Walkersville, MD, USA)
Humanes Serum Albumin 20% (HSA)	Baxter (Unterschleifheim, D)
L-Glutamin	PAA (Linz, A)
Penicillin	PAA (Linz, A)
<i>Phosphate-buffered-saline</i> (PBS)	PAA (Linz, A)
RPMI 1640	Biochrom (Berlin, D)
Streptomycin	PAA (Linz, A)

2.3.6. Zytokine, Wachstumsstimulatoren und Stimulanzen

Name	Firma
Calcium-Ionomycin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
CD40-Ligand (CD40-L)	Immunex (Seattle, WA, USA)
<i>Granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor</i> (GM-CSF) Leukine®	Immunex (Seattle, WA, USA)
Interferon- α (IFN- α)	Strathmann Biotech (Hannover, D)
Interferon- γ (IFN- γ)	Strathmann Biotech (Hannover, D)
Interleukin-1 β (IL-1 β)	Strathmann Biotech (Hannover, D)
Interleukin-2 (IL-2)	Strathmann Biotech (Hannover, D)
Interleukin-4 (IL-4)	Promega (Madison, WI, USA)

Interleukin-7 (IL-7)	Strathmann Biotech (Hannover, D)
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Phytohämagglutinin (PHA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Prostaglandin E ₂ (PGE ₂)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)	R&D Systems (Wiesbaden, D)

2.3.7. Zellkulturmedien, Lösungen und Puffer

2.3.7.1. Zellkultur, FACS, ELISPOT, ELISA

<p><u>DC-Medium</u></p> <p>RPMI 1640 + 2 Vol% AB-Serum + 2 mM L-Glutamin + 100 IU/ml Penicillin + 100 μg/ml Streptomycin</p> <p><u>T2-Zell Medium</u></p> <p>RPMI 1640 + 10 Vol% FCS + 2 mM L-Glutamin + 100 IU/ml Penicillin + 100 μg/ml Streptomycin</p> <p><u>MACS-Puffer</u></p> <p>PBS + 2 mM EDTA + 0,5 Vol% HSA pH 7,2-7,4</p> <p><u>Streptamer Puffer</u></p> <p>PBS + 0,5 Vol% BSA</p>	<p><u>ELISPOT-Waschpuffer</u></p> <p>PBS + 0,05 Vol% Tween20</p> <p><u>ELISPOT-Blockpuffer</u></p> <p>PBS + 5 Vol% Sucrose + 1 Vol% BSA</p> <p><u>ELISA-Waschpuffer</u></p> <p>PBS + 0,05 Vol% Tween 20</p> <p><u>ELISA Assay diluent</u></p> <p>PBS + 10 Vol% FCS</p> <p><u>CCR-7 Färbung Puffer</u></p> <p>PBS + 3 Vol% FCS</p>
---	---

2.3.7.2. cDNA, PCR

<u>Lyse-/ Bindepuffer</u> 4,5 M Guanidiniumchlorid 50 mM Tris-HCl 30 Vol % Triton X-100 pH 6,6 in Wasser	<u>DNase Inkubationspuffer</u> 1 M NaCl 20 mM Tris-HCl 10 mM MnCl ₂ pH 7,0 in Wasser
<u>Waschpuffer I</u> 5 M Guanidiniumchlorid 20 mM Tris-HCl 60 Vol % Ethanol pH 6,6 in Wasser	<u>Waschpuffer II</u> 20 mM NaCl 2 mM Tris-HCl 80 Vol % Ethanol pH 7,5 in Wasser
<u>Elutions-Puffer</u> Nuclease-freies steriles Wasser	<u>TBE-Puffer</u> 100 mM Tris-Base 100 mM Tris-Borat 2 mM EDTA pH 8,3 in Wasser

2.3.8. Antikörper und Streptamere MHC-I-Komplexe

Antikörper	Klon	Isotyp	Herkunft
Anti CD14	M5E2	Maus IgG _{2a} , κ	B/D Pharmingen
Anti CD3	UCHT 1	Maus IgG ₁ , κ	B/D Pharmingen
Anti CD4	RPA-T4	Maus IgG ₁ , κ	B/D Pharmingen
Anti CD40	5C3	Maus IgG ₁ , κ	B/D Pharmingen
Anti CD45R0	UCHC 1	Maus IgG _{2a} , κ	B/D Pharmingen
Anti CD45RA	HI100	Maus IgG _{2b} , κ	B/D Pharmingen
Anti CD56	B159	Maus IgG ₁ , κ	B/D Pharmingen
Anti CD8	RPA-T8	Maus IgG ₁ , κ	B/D Pharmingen
Anti CD80	L307.4	Maus IgG ₁ , κ	B/D Pharmingen
Anti CD83	HB15e	Maus IgG ₁ , κ	B/D Pharmingen
Anti CD86	2331/FUN-1	Maus IgG ₁ , κ	B/D Pharmingen
Anti HLA-A2	BB7.2	Maus IgG _{2b} , κ	B/D Pharmingen

Anti HLA-DR	L243	Maus IgG _{2b} , κ	Becton Dickinson
Anti HLA-DR, DP, DQ (MHC II)	Tü 39	Maus IgG _{2a} , κ	B/D Pharmingen
Biotin Anti-Rat IgG _{2a}	RG7/1.30	Maus IgG _{2b} , κ	B/D Pharmingen
IFN-γ Alexa 488 Fluor	B27	Maus IgG ₁	Caltag
Isotyp Maus IgG ₁ , κ	MOPC 21	Maus IgG ₁ , κ	B/D Pharmingen
Isotyp Maus IgG _{2a} , κ	G155-178	Maus IgG _{2a} , κ	B/D Pharmingen
Isotyp Maus IgG _{2b} , κ	27-35	Maus IgG _{2b} , κ	B/D Pharmingen
Maus IgG1 Isotyp Alexa Fluor 488			Caltag
Rat-Anti CCR-7 IgG _{2a}	3D12	Ratte- IgG _{2a}	Prof. R. Förster (Hannover, D)
Streptavidin- APC	Streptavidin		B/D Pharmingen

Polymerer MHC-I-Komplex (Streptamere)	Herkunft
MHC-I-Strep HLA-A*0201, Mart 1, ELAGIGILTV	IBA (Göttingen, D)
Strep-Tactin-PE	IBA (Göttingen, D)

2.3.9. Peptide

Peptid	Peptid-Sequenz (N→C)	HLA-Typ	Referenz
HIV Pol ₄₇₆₋₄₈₄	ILKEPVHGV	HLA-A2	[Ogg, 1998]
Melan-A ₂₆₋₃₅ A27L	ELAGIGILTV	HLA-A2	[Valmori, 1998]

Das mit dem malignen Melanom assoziierte Differenzierungsantigen Melan-A/MART-1 enthält ein T-Zell Epitop mit der Sequenz ELAGIGILTV und wird als Melan-A₂₆₋₃₅ bezeichnet. Es besitzt durch eine Substitution von Leucin (L) statt Alanin (A) an der Position 27 eine höhere Immunogenität als das physiologische Peptid. Hergestellt wurde dieses Peptid von der Firma Jerini (Berlin, D).

Außerdem wurde das HIV Peptid HIV-Pol eingesetzt, welches vom GSF Forschungszentrum München (Dr. Arnolds, München, D) synthetisiert wurde. Durch HPLC-Analyse konnte in beiden Fällen eine Reinheit der Peptide von über 90% gesichert werden. Die lyophilisierten Peptide wurden bis zu ihrem Einsatz in 2,5 % DMSO-Lösung bei -20°C aufbewahrt. Im weiteren Verlauf werden diese beiden Peptide mit Mel und Pol bezeichnet.

2.3.10. Antigen

Antigen	Firma
Tetanustoxoid	Statens Serum Institut (Kopenhagen, Dänemark)

2.3.11. Zelllinie

Zelllinie	Zellart	Herkunft	Referenz
T2	Humane lymphoblastoide Zelllinie, positiv für HLA-A2	<i>American Type Culture Collection (ATCC)</i>	[Salter, 1985]

T2-Zellen sind TAP-inaktivierte Zellen, die einfach mit Peptiden zu beladen sind, welche dann als Peptid-MHC-I-Komplex immunregulatorischen Zellen präsentiert werden können. In der vorliegenden Arbeit wurden T2-Zellen mit den Peptiden Mel und Pol beladen.

2.3.12. Statistische Analyse

Bei den Experimenten mit Mehrfachwerten oder mehreren Spendern sind die Ergebnisse als arithmetisches Mittel und Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of mean*, SEM) angegeben. Die statistische Signifikanz der Unterschiede einzelner Ergebnisse wurde mit dem zweiseitigen Student-Test für paarige Stichproben überprüft. Statistische Signifikanz wurde bei Werten von $p < 0,05$, $p < 0,01$ bzw. $p < 0,001$ angenommen und durch Markierung mit * bis *** gekennzeichnet. Alle statistischen Berechnungen wurden mit Microsoft-Excel vorgenommen. Die Analysen der FACS-Daten wurde mit Cell-Quest-Software und die ELISA Messungen mit Claris-Works erstellt. Alle anderen statistischen Berechnungen und die graphische Darstellung der Daten wurden mit Microsoft-Excel und Microsoft-Power-Point (Microsoft Cooperation, CA, USA) vorgenommen.

3. Ergebnisse

3.1. Direkter Vergleich von *FastDCs* mit moDCs

3.1.1. Versuchsaufbau der dreiwöchigen Kokultur (Abbildung 1)

Von vier Spendern wurden moDCs generiert (fünf Tage Ausdifferenzierung und zwei Tage Aktivierung, siehe 2.1.1.5.1.). Denselben Spendern wurde drei Tage vor Beendigung des moDC Protokolls erneut Blut abgenommen und daraus *FastDCs* (Differenzierungs- und Aktivierungsphase jeweils nur 24 Stunden) gewonnen. In den letzten vier Stunden der Aktivierungsphase wurden sowohl den *Fast-* als auch den moDCs das Peptid Melan-A zur Antigenaufnahme zugeführt. Nachdem in beiden DC Gruppen die Aktivierung vollendet war, wurden beide DC Gruppen geerntet, gezählt und durchflusszytometrisch auf ihre Reife und Reinheit hin untersucht. Anschließend wurden die gewonnen DCs mit pan-T-Zellen für drei Wochen kokultiviert. Im wöchentlichen Abstand wurden die Kokulturen mit frisch generierten, Antigen-beladenen DCs vom gleichen Spender restimuliert. Am Ende wurde mit unterschiedlichen Methoden untersucht, ob Melan-A-spezifische T-Zellen induziert wurden, die auch ihre Zielzellen lysieren können.

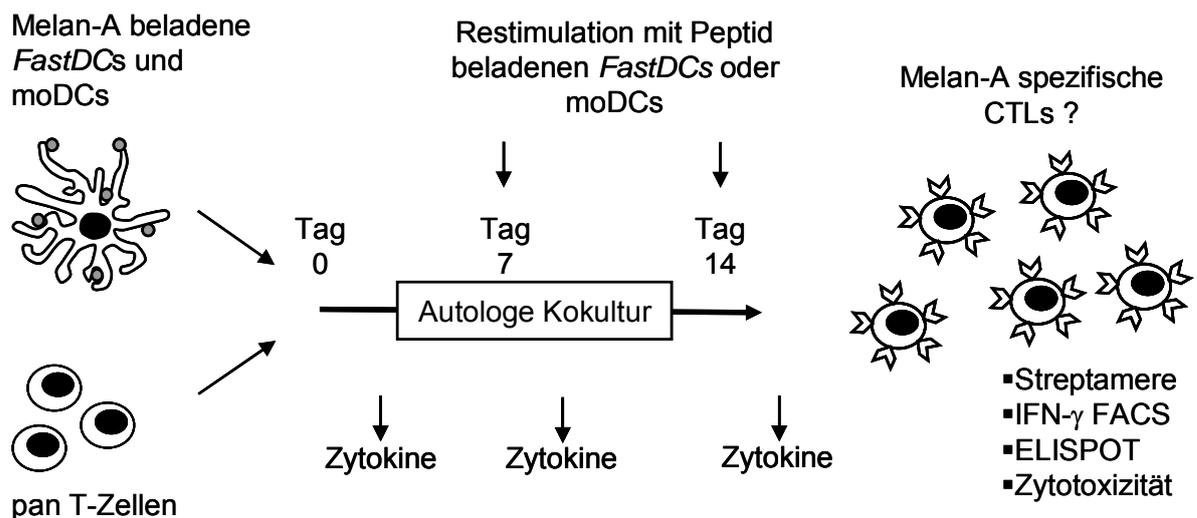


Abbildung 1: Versuchsaufbau zum Vergleich der Induktion Antigen-spezifischer zytotoxischer T-Zellen durch moDCs und *FastDCs*.

3.1.1.1. Ausbeute und Reinheit

Als erstes wurde untersucht ob sich *FastDCs* von moDCs in Bezug auf Reife oder Reinheit unterscheiden. Zudem interessierte die Ausbeute ausgereifter DCs bei den zwei Protokollen.

Anhand der Oberflächenmarker, die durchflusszytometrisch bestimmt wurden, konnte festgestellt werden, dass sowohl *FastDCs* als auch moDCs phänotypisch das typische Muster ausgereifter DCs aufweisen: CD14⁻, CD83⁺, CD80⁺, CD86^{+viel}, MHC-II^{viel} (Abbildung 2).

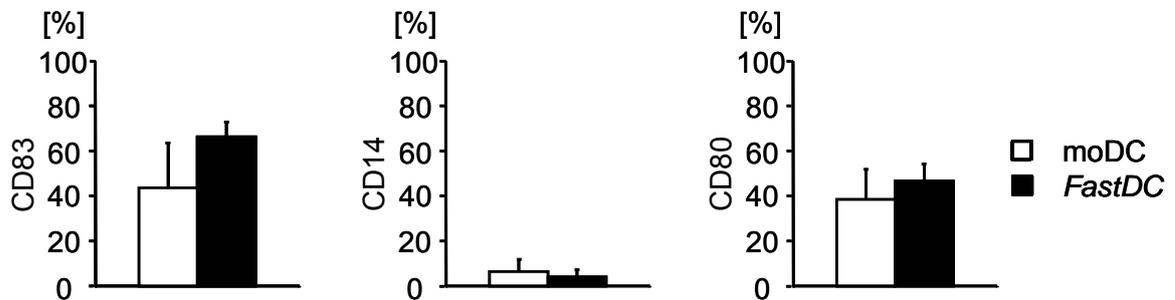


Abbildung 2: Sowohl das *FastDC*- als auch das moDC-Protokoll ergibt ausgereifte dendritische Zellen. Dendritische Zellen wurden nach Vollendung des jeweiligen Protokolls geerntet und durchflusszytometrisch analysiert (n=4).

Im Gegensatz zu den moDCs wiesen die *FastDCs* jedoch eine 5-10%ig höhere Reinheit auf (Abbildung 3A, B).

Die Ausbeute der jeweiligen Protokolle wurde mit Hilfe der Neugebauer Zählkammer bestimmt, indem man auszählte wie viele Zellen der eingesetzten Monozyten nach Durchführung des jeweiligen Generierungsprotokolls noch vital waren. Auch hier war das *FastDC*-Protokoll dem Standard überlegen, da man eine deutlich höhere Ausbeute, bis zu 35% mehr, als mit dem moDC-Protokoll erzielen konnte (Abbildung 3B).

Um auszuschließen, dass die niedrigere Ausbeute der moDCs durch zu geringe Zytokinmengen während der Differenzierungsphase bedingt war - sie bekamen dieselbe Menge an IL-4 und GM-CSF wie *FastDCs*, waren aber einen vielfach längeren Zeitraum in Kultur- wurde ein weiterer Versuch durchgeführt. Hier wurden *FastDCs* und moDCs generiert und zusätzlich moDC-Kulturen angesetzt, die sowohl zu Beginn als auch an Tag 3 und Tag 5 der Differenzierungsphase IL-4 und GM-CSF hinzugefügt bekamen. Dabei zeigte sich jedoch, dass die zusätzlichen Zytokine keine wesentliche

Besserung der moDC-Ausbeute bewirkten und das *FastDC*-Protokoll weiter überlegen war. In Abbildung 3C sieht man, dass die Ausbeute bei moDCs 36% und 38% bei jenen mit zusätzlich IL-4/GM-CSF betrug. Im Vergleich dazu ließen sich 64% der Monozyten in *FastDC*s umwandeln. Auch wurde untersucht, ob sich die Ausbeute der moDCs durch Verkürzung der Aktivierungsphase von 48 Stunden auf 24 Stunden verändert, was jedoch keinen Unterschied ergab. Im Gegensatz zu den Zellen aus Abbildung 3A und 3B waren die dendritischen Zellen in Abbildung 3C nicht mit Melan-A-Antigen beladen.

Obwohl die Ausbeute in verschiedenen Experimenten unterschiedlich ausfiel und nicht immer statistische Signifikanzen aufwies, wurde mit dem *FastDC*-Protokoll immer eine um etwa 20% erhöhte Ausbeute gegenüber dem moDC-Protokoll erreicht. (Abbildung 3C; $p=0,055$ für *FastDC* im Vergleich zu moDCs und $p=0,067$ für *FastDC*s im Vergleich zu moDCs+IL-4/GM-CSF).

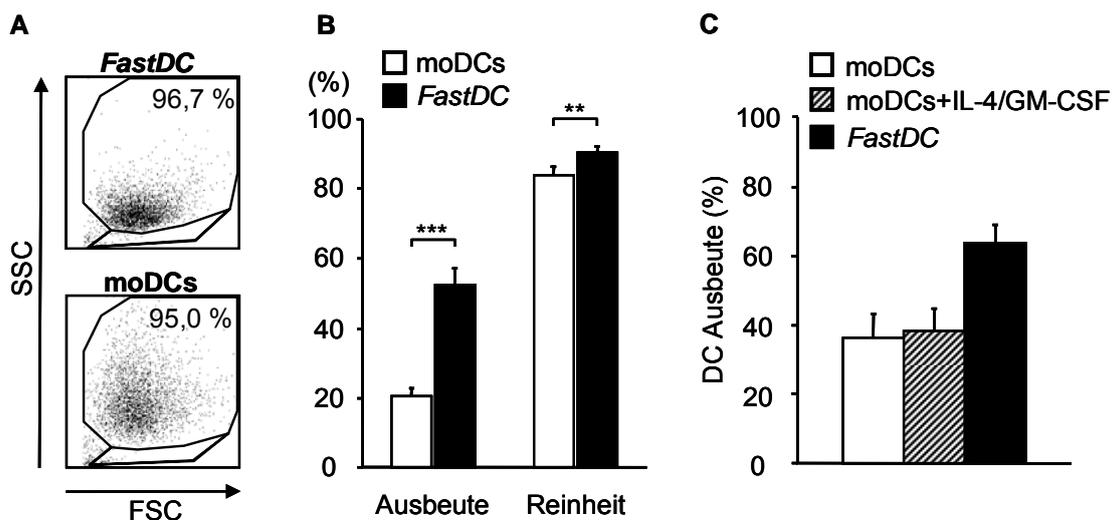


Abbildung 3: Das *FastDC*-Protokoll ergibt eine höhere Ausbeute und Reinheit als das moDC-Protokoll. Die *Life-Gate* Analyse der FACS-Messungen ergab den prozentualen Anteil lebendiger *FastDC*s und moDCs und die Reinheit der Zellpopulationen. Die Ausbeute wurde festgestellt, indem unter dem Lichtmikroskop gezählt wurde wie viele der zu anfangs einsetzten Monozyten nach Vollendung des jeweiligen Protokolls noch vital waren. (**3A**: *Life-Gate* Analyse eines repräsentativen Spenders von insgesamt vier; **3B**: Mittelwerte \pm SEM der Ausbeute und Reinheit von vier Spendern, die insgesamt dreimal zur Generierung von *FastDC*s und moDCs für die dreiwöchige Kokultur Blut spendeten; $**p<0,01$, $***p<0,001$). Um zu niedrige Zytokinmengen als Grund für die geringe Ausbeute bei den moDCs auszuschließen, wurden in einem unabhängigen Versuch moDCs generiert, die an Tag 3 und 5 der Differenzierungsphase nochmals IL-4 und GM-CSF zugesetzt bekamen. (**3C**: Mittelwert \pm SEM von vier Spendern).

3.1.1.2. Das Zytokinprofil der dendritischen Zellen und der T-Zellen

Nach abgeschlossener Generierung der beiden DC-Populationen wurden die Überstände entnommen und mittels ELISA die Zytokine IL-18 und IL-12, beide starke Induktoren einer Typ T_H1 -Immunantwort [Langenkamp, 2000; Nakanishi, 2001], darin bestimmt. Außerdem wurden regelmäßig zu verschiedenen Zeitpunkten (48 Stunden nach Ansetzen der Kokultur und 48 bis 96 Stunden nach erster und zweiter Restimulation) die Überstände der Kokulturen auf ihren Zytokingehalt hin untersucht. Dabei wurden die Zytokine IFN- γ und IL-4 bestimmt.

Insgesamt waren die in allen DC Überständen gemessenen IL-12(p70) Konzentrationen sehr niedrig. Es zeigte sich aber, dass die *FastDCs* trotzdem beinahe doppelt so viel Zytokin produzierten wie die moDCs (Abbildung 4 oben links). Auch zeigten die *FastDCs* eine Tendenz zu einer höheren IL-18 Produktion als die vergleichbaren moDCs (Abbildung 4 oben rechts). IL-10 lag fast bei allen Bedingungen unter der Nachweisgrenze des verwendeten ELISAs (Daten nicht gezeigt). Die Antigenbeladung der *FastDCs* und moDCs hatte in unserem Experiment keinen relevanten Einfluß auf die Produktion der gemessenen Zytokine.

In den Kokulturen hingegen konnte eine gesteigerte Produktion von IFN- γ nachgewiesen werden, wenn Melan-A-beladene DCs verwendet wurden. Dabei spielte es jedoch keine Rolle, ob für die Sensitivierung *FastDCs* oder moDCs verwendet worden sind (Abbildung 4 unten links). IL-4 konnte in keiner Kokultur in nennenswerten Mengen nachgewiesen werden (Abbildung 4 unten rechts).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der Zytokinuntersuchungen darauf hin, dass beide DC-Populationen, sowohl *FastDCs* als auch moDCs, die induzierte Immunreaktion vorwiegend in eine T_H1 -gewichtete Richtung lenken.

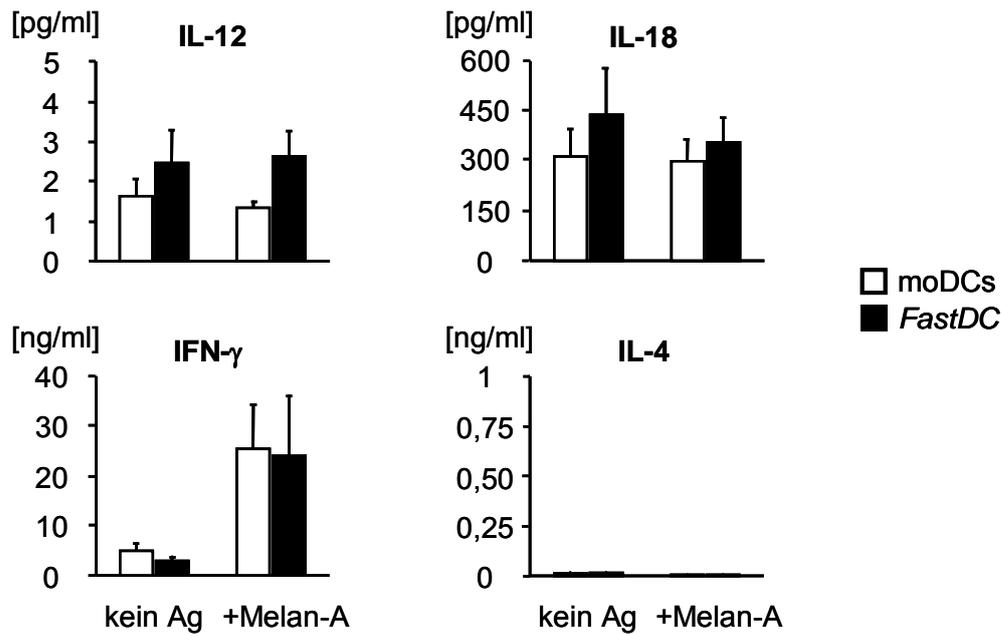


Abbildung 4: Die von DCs und Kokultur gewonnenen Überstände zeigen eine T_H1 -gewichtete Immunantwort. Obere Zeile: Die Überstände der *FastDCs* und *moDCs* für die IL-12(p70) und IL-18 Messungen wurden sofort nach jeweils abgeschlossener Generierung gewonnen. **Untere Zeile:** Wie unter 2.1.1.10 erläutert, wurden $CD3^+$ pan-T-Zellen mit autologen Antigen-beladenen oder unbeladenen *FastDCs* und *moDCs* im Verhältnis 10:1 in Kokultur gebracht. IFN- γ und IL-4 wurden 96 Stunden nach der ersten Restimulation in den Überständen bestimmt. Die Zytokinmessung erfolgte mit ELISA. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM aus vier Spendern.

3.1.1.3. Induktion Peptid-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen

Drei Tage nach der zweiten Restimulation der autologen Kokultur mit frisch generierten Melan-A-beladenen *FastDCs* und *moDCs* wurde die spezifische Bindung der $CD8^+$ T-Zellen an MHC-I/Melan-A Streptamere, und damit die Spezifität der T-Zell-Rezeptoren, untersucht. Als Kontrolle dienten pan-T-Zellen, die niemals *in vitro* Kontakt zu dendritischen Zellen gehabt hatten, und T-Zellen aus Kokulturen mit unbeladenen *Fast*- und *moDCs*. Der Anteil der Melan-A-spezifischen $CD8^+$ CTLs betrug in beiden Kulturen etwa 15% (Abbildung 5B). Die *FastDCs* und *moDCs* waren also gleichwertig hinsichtlich der Induktion Peptid-spezifischer $CD8^+$ Zellen. In den Kontrollexperimenten mit reinen T-Zellen und mit T-Zellen, die mit unbeladenen DCs kokultiviert wurden, konnten hingegen keine Streptamer bindenden Melan-A-spezifischen T-Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

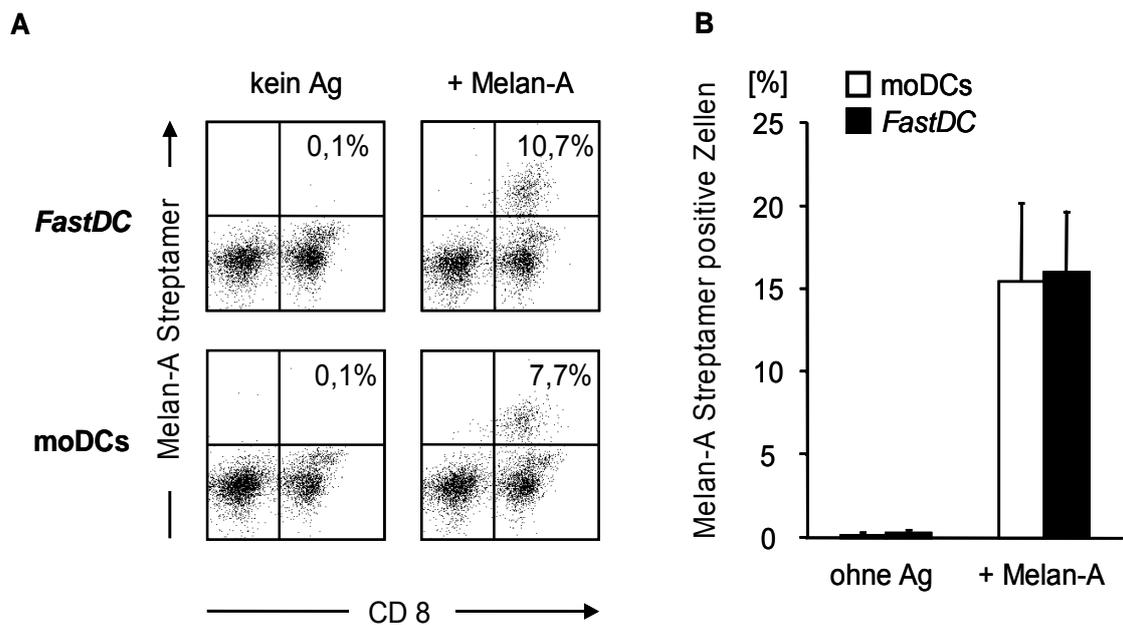


Abbildung 5: Die Anzahl Melan-A/Streptamer bindender CD8⁺ T-Zellen ist nach Kokultur mit *FastDCs* und *moDCs* gleich. Autologe T-Zellen wurden zweimal restimuliert mit unbeladenen *FastDCs* (**A**: oben links), unbeladenen *moDCs* (**A**: unten links), Melan-A-beladenen *FastDCs* (**A**: oben rechts) und Melan-A-beladenen *moDCs* (**A**: unten rechts). Drei Tage nach der zweiten Restimulation mit Melan-A-beladenen oder unbeladenen DCs wurde durchflusszytometrisch untersucht, inwieweit die CD8⁺ T-Zellen fähig sind, spezifische Bindungen mit MHC-I/Melan-A Streptameren einzugehen (**B**: Daten zeigen Mittelwert ± SEM von vier Spendern).

Parallel dazu wurde zwei Stunden nach der zweiten Restimulation eine intrazelluläre Färbung von IFN- γ bei den T-Zellen durchgeführt, um die Anzahl der Antigen-spezifischen, IFN- γ produzierenden T-Zellen im FACS zu quantifizieren. Diese Untersuchung zeigte qualitativ die gleichen Ergebnisse wie die Streptamer-Analyse, zeigte quantitativ allerdings Werte, die nur ungefähr einem Drittel entsprachen (Abbildung 6). Wie erwartet war die IFN- γ Produktion auf die CD8⁺ T-Zellen beschränkt, welche in Kokultur mit Peptid-beladenen DCs waren. In T-Zellen, die nur mit unbeladenen DCs in Kultur waren, konnte keine IFN- γ Produktion nachgewiesen werden.

FastDCs und *moDCs* induzieren also gleich gut Antigen-spezifische, IFN- γ produzierende CD8⁺ T-Zellen.

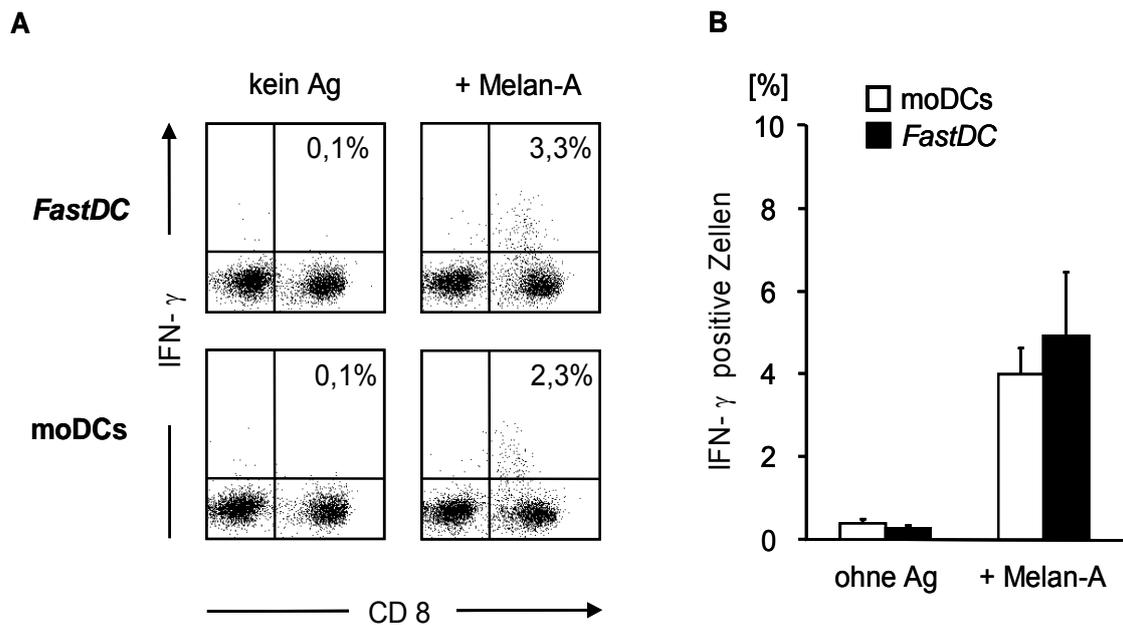


Abbildung 6: Beide DC-Präparationen induzieren vergleichbar viele Melan-A-spezifische, IFN- γ produzierende CD8⁺ T-Zellen. Autologe T-Zellen wurden zweimal restimuliert mit unbeladenen *FastDCs* (A: oben links), unbeladenen moDCs (A: unten links), Melan-A-beladenen *FastDCs* (A: oben rechts) und Melan-A-beladenen moDCs (A: unten rechts). Mit der FACS-Methode wurde zwei Stunden nach der zweiten Restimulation die Anzahl der IFN- γ produzierenden CD8⁺ T-Zellen analysiert (B: Daten zeigen Mittelwert \pm SEM von vier Spendern).

3.1.1.4. Induktion einer T_H1-gewichteten Immunantwort

Die Bildung von IFN- γ bei stimulierten T-Zellen wurde auch mittels ELISPOT untersucht. Für die Analyse wurden unmittelbar vor der zweiten Restimulation T-Zellen aus den Kokulturen entnommen und in den für den ELISPOT speziellen 96-Loch Platten mit frischen *Fast*- und moDCs restimuliert. Als Kontrollen dienten

- unstimulierte, nur in Medium kultivierte T-Zellen
- T-Zellen aus den Kokulturen mit unbeladenen DCs, welche mit denselben unbeladenen DCs oder mit denselben Melan-A-beladenen DCs restimuliert wurden
- T-Zellen aus Kokulturen mit Melan-A-beladenen DCs, welche mit denselben unbeladenen DCs restimuliert wurden oder mit DCs, welche mit einem irrelevanten Peptid (HIV-Pol) beladen waren.

Zur Kontrolle der Testqualität wurde die Abweichung der Proben von ihrem Mittelwert berechnet. Für die verschiedenen Protokolle war die mittlere Abweichung von jeweils vier Spendern <11%.

Im ELISPOT zeigte sich, dass Antigen-spezifische IFN- γ produzierende T-Zellen nur dann nachgewiesen werden konnten, wenn die Zellen aus Kokulturen mit Melan-A-beladenen *Fast*- oder moDCs stammten und die T-Zellen mit denselben Melan-A-beladenen DCs restimuliert wurden. T-Zellen inkubiert mit Melan-A-beladenen *Fast*- oder moDCs waren nicht in der Lage IFN- γ zu produzieren, wenn sie mit denselben unbeladenen oder HIV-Pol-beladenen DCs restimuliert wurden (Abbildung 7A).

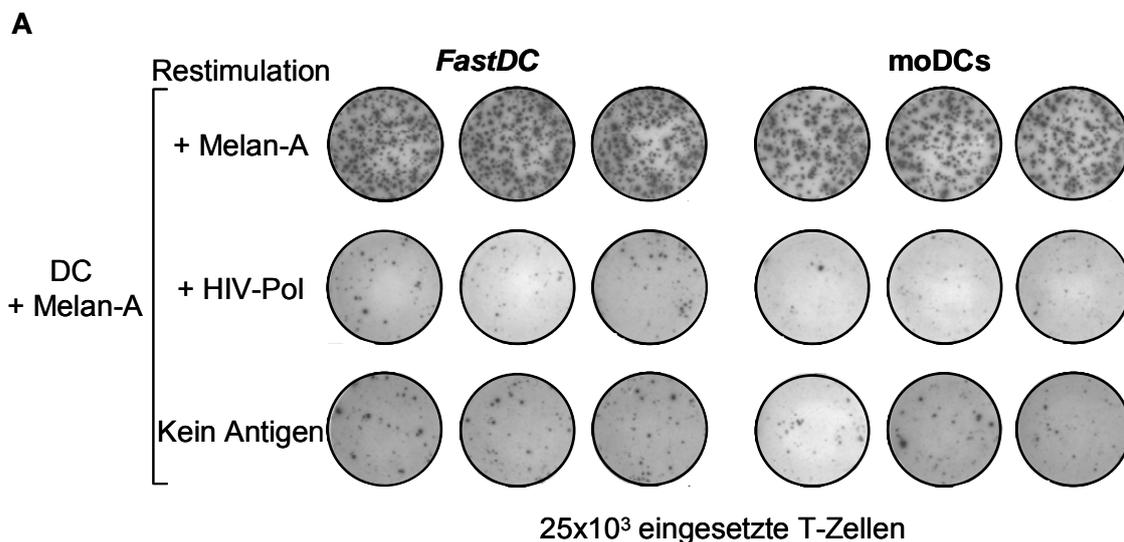


Abbildung 7A: Analyse der Stimulation der IFN- γ Bildung von T-Zellen im ELISPOT (Ausschnitt einer 96-Loch Platte). T-Zellen aus Kokulturen mit Melan-A-beladenen DCs wurden zuerst mit denselben frischen Melan-A-beladenen DCs restimuliert. Für die zweite Restimulation wurden DCs vom gleichen Spender verwendet, die mit keinem Antigen, mit Melan-A oder mit HIV-Pol Antigen beladen waren. Das Verhältnis T-Zellen zu DCs betrug bei der Restimulation 10:1. Von den Ansätzen wurden Triplikate angefertigt. Das repräsentative Beispiel eines Spenders zeigt, dass nur die Restimulation mit Melan-A-tragenden DCs bei den T-Zellen zu einer IFN- γ Produktion führt.

Die Anzahl der Punkte ist gleichzusetzen mit der Anzahl IFN- γ produzierender Zellen. Bei T-Zellen, die mit Melan-A-beladenen DCs in Kokultur waren, und die mit HIV-Pol-beladenen DCs restimuliert wurden, entsprach der Wert in etwa dem von gänzlich unstimulierten T-Zellen (nicht abgebildet). Die Ergebnisse aus der ELISPOT-Untersuchung bestätigten die Befunde aus der FACS-Analyse, dass beide DC-

Populationen eine vergleichbare Anzahl von Melan-A-spezifischen IFN- γ produzierenden T-Zellen induzieren können. Im ELISPOT war die ermittelte Fraktion jedoch geringer als in der FACS-Analyse. Von 25000 T-Zellen wurden nach Restimulation mit Antigen-beladenen moDCs 1,2% IFN- γ produzierende Zellen nachgewiesen und 1,4% nach Restimulation mit Antigen-beladenen *FastDCs*. In den jeweiligen Kontrollgruppen mit HIV-Pol Antigen betrug die Rate nur 0,4%. (Abbildung 7B).

Wie in Abbildung 7B gezeigt, waren bei 25000 eingesetzten T-Zellen die *FastDCs* in der Lage, signifikant mehr IFN- γ produzierende T-Zellen zu induzieren als moDCs. Zusammengefasst kann man sagen, dass Peptid-beladene *FastDCs* die Fähigkeit besitzen, eine Tumorantigen-spezifische Immunantwort vom T_H1-Typ hervorzurufen und dabei den moDCs nicht unterlegen sind.

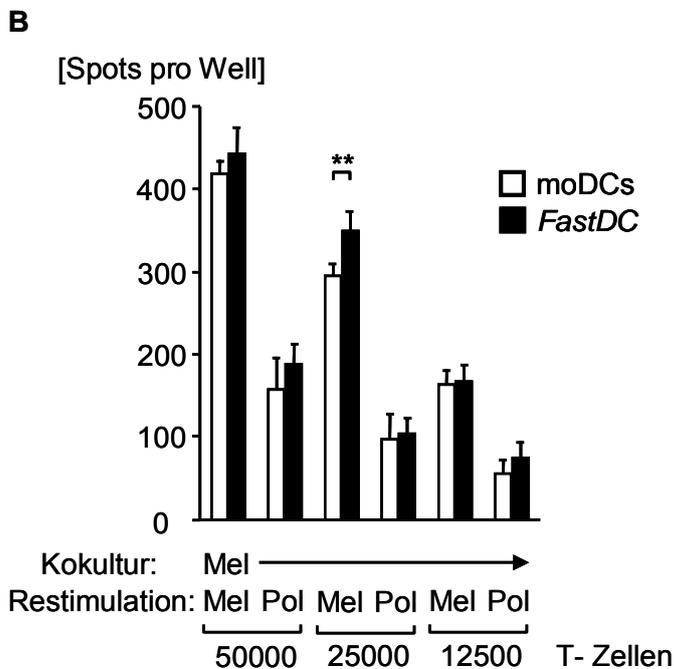


Abbildung 7B: Mit *FastDCs* geprimte T-Zellen produzieren Antigen-spezifisch IFN- γ . Quantitative Auswertung der ELISPOT-Analysen, bei denen eine unterschiedliche Zahl von T-Zellen mit unterschiedlich beladenen DCs zum zweiten Mal restimuliert wurden (Mel=DC-Beladung mit Melan-A, Pol=DC-Beladung mit HIV-Pol). Die IFN- γ Bildung wurde durch Melan-A stimuliert. Nach Stimulation mit dem Kontroll-Peptid HIV-Pol wurden weniger IFN- γ spots gefunden, ihre Anzahl war vergleichbar der Anzahl nach Restimulation mit unbeladenen DCs (Daten nicht gezeigt). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von vier Spendern.

3.1.1.5. Lytische Aktivität der Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen

Mit einem Standard ⁵¹*Chrom Release assay* wurde vier Tage nach der zweiten Restimulation die Zytotoxizität der T-Zellen aus der Kokultur mit Melan-A-beladenen *Fast*- oder moDCs überprüft. Dafür wurden T2-Zellen mit Melan-A oder mit dem, für T-Zellen unbekanntem, HIV-Pol Antigen beladen und als Zielzellen verwendet. Dabei zeigte sich, dass T-Zellen aus der Kokultur mit Melan-A-beladenen *FastDCs* eine höhere lytische Aktivität gegen Melan-A-tragende T2-Zellen aufwiesen als T-Zellen aus der Kokultur mit moDCs (Abbildung 8A). HIV-Pol-beladene T2-Zellen wurden von Melan-A *geprimeten* T-Zell Populationen nur in geringfügiger Masse lysiert, unabhängig davon, ob in der Kokultur *Fast*- oder moDCs waren (Abbildung 8A). Um auszuschließen, dass die höhere Lyserate auf eine Erhöhung der unspezifischen Lyse zurückzuführen war, wurde die Lyserate von HIV-Pol-Peptid-tragenden T2-Zellen von der Melan-A-beladener T2-Zellen subtrahiert (Abbildung 8B). In den niedrigeren Effektor/Zielzell Verhältnissen 40:1 und 20:1 konnte man erkennen, dass T-Zellen aus der Koinkubation mit *FastDCs* signifikant besser ihre Zielzellen lysieren konnten als die vergleichbaren T-Zellen aus Kulturen mit moDCs. Insgesamt betrachtet scheint es so, dass sowohl *Fast*- als auch moDCs in der Lage sind, Antigen-spezifische T-Zellen zu induzieren, wobei T-Zellen, die mit *FastDCs* inkubiert werden, eine effektivere Lyse der relevanten Zielzellen bewirken.

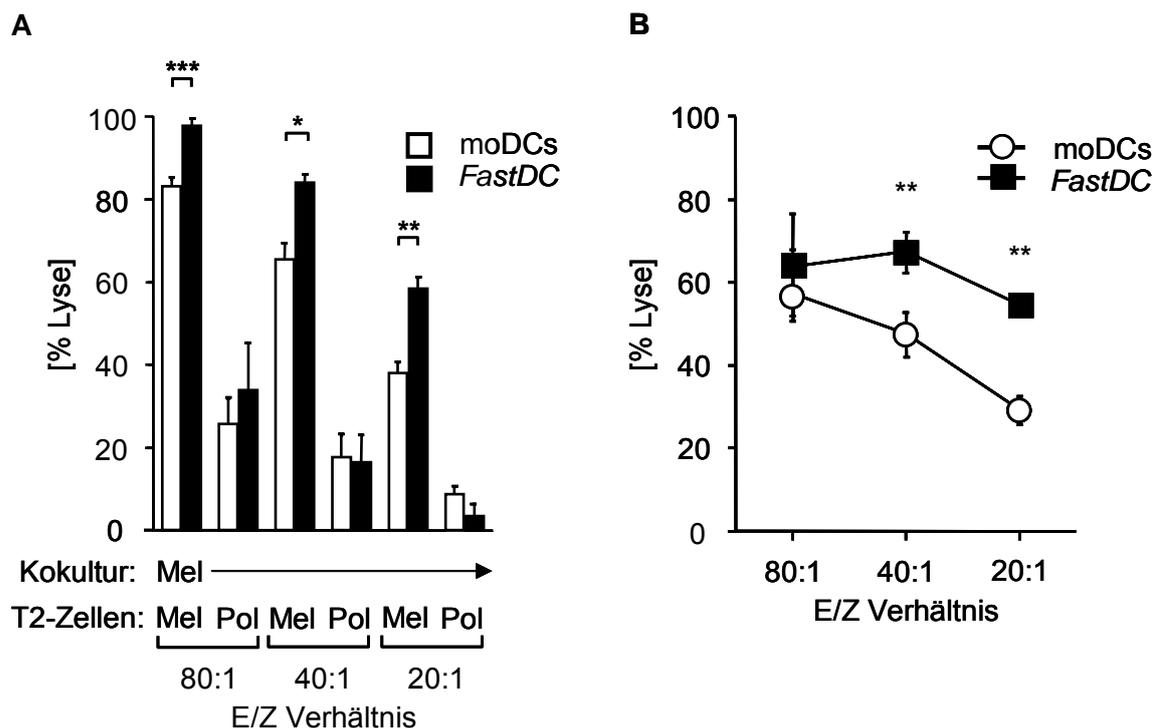


Abbildung 8: Zytotoxische T-Zellen lysieren ihre Zielzellen besser, wenn *FastDCs* statt *moDCs* zum *priming* verwendet wurden. Vier Tage nach der zweiten Restimulation wurde die lytische Kapazität der zytotoxischen T-Zellen aus den Kokulturen mit einem ^{51}Cr -release Assay analysiert. Die T-Zellen wurden aus den Kokulturen mit Melan-A-beladenen *Fast*- und *moDCs* geerntet und in verschiedenen Verhältnissen mit Melan-A oder HIV-Pol-beladenen T2-Zielzellen, welche mit ^{51}Cr markiert waren, inkubiert. Nach vierstündiger Inkubation wurden die Überstände entnommen und in einem γ -counter die ^{51}Cr -Aktivität darin gemessen, was der lytischen Kapazität entsprach. **A:** Gesamtlyse durch zytotoxische T-Zellen. **B:** Spezifische Lyse (die unspezifische Lyse rate von HIV-Pol-beladenen T2-Zellen wurde subtrahiert von der mit Melan-A-beladenen). Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm SEM von vier Spendern. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.2. Modifizierung des *FastDC*-Protokolls und Analyse der Zellen

3.2.1. *FastDCs* in zytokinfreier Kultur

3.2.1.1. Phänotypische Reife der unterschiedlichen *FastDCs*

Nachdem festgestellt worden ist, dass *FastDCs* den moDCs in keiner Weise unterlegen, sondern teils überlegen sind, stellte sich die Frage, ob es möglich wäre, das von uns benutzte *FastDC*-Protokoll noch zu verbessern. Dafür wurde zuerst die Differenzierungsphase der DCs variiert. Außer GM-CSF und IL-4 wurde zusätzlich noch IFN- α zugefügt. Die *FastDCs* wurden wie bisher für 24 Stunden mit IL-4 und GM-CSF (*FastDCs*) oder mit IL-4, GM-CSF und IFN- α (IFN- α -*FastDCs*) inkubiert und anschließend für weitere 24 bis 36 Stunden mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β , TNF- α und PGE₂ aktiviert. Anschließend folgte eine so genannte *wash-out* Kultur. Das bedeutet, dass die DCs nach Abschluss des Protokolls gewaschen und in purem DC-Medium ohne weiteren Zusatz von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren kultiviert werden. Für die *wash-out* Kultur wurde zuerst ein Zeitraum von zwei Tagen gewählt. Während dieser Zeit wurden die DCs zu Beginn der Kultur, nach 24 und nach 48 Stunden phänotypisch auf ihre Oberflächenmarkerexpression untersucht. Dabei wurde ersichtlich, dass der Einfluss von IFN- α zum Zeitpunkt 0, also kurz nach dem „Waschen“, keinen Einfluss auf das Überleben der Zellen hatte und beide *FastDC*-Arten eine homogene Population bildeten (Abbildung 9, linke Seite). Die Expression des Reifemarkers CD83 von IFN- α -*FastDCs* war anfangs im Vergleich zu *FastDCs* nur wenig vermehrt (Abbildung 9, 2. Spalte von links). Nach der 48-stündigen *wash-out* Kultur war die Reifemarkereexpression in *FastDCs* gering abgefallen, während sie unter dem Zusatz von IFN- α konstant blieb (Abbildung 9, rechte Spalte). Die Reinheit war in beiden Populationen annähernd gleich.

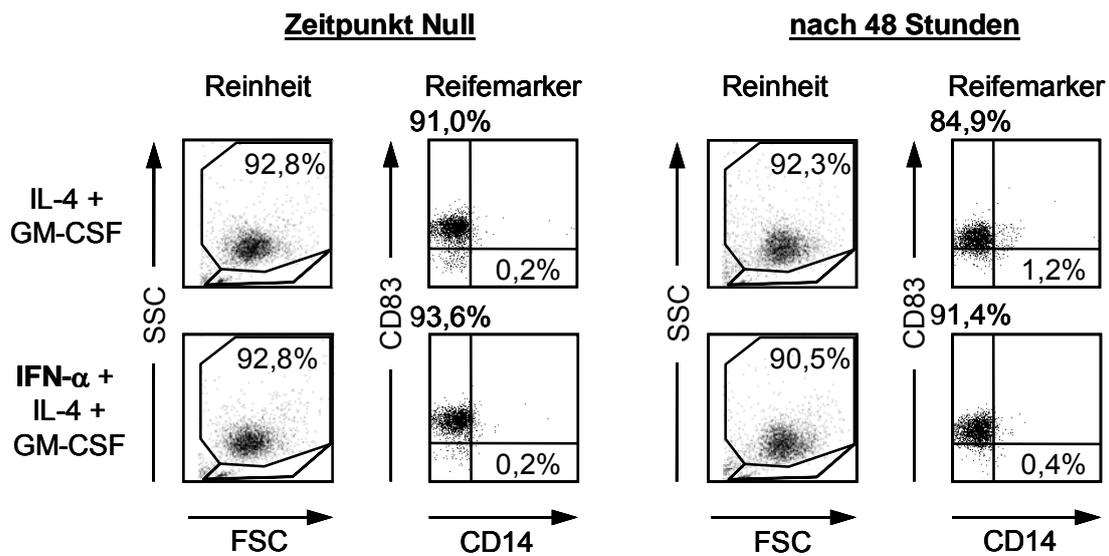


Abbildung 9: Die zytokinfreie Kultivierung über 48 Stunden zeigt bei IFN- α -FastDCs die Tendenz für eine stabilere, länger andauernde Reifemarkerexpression. FastDCs wurden aus Monozyten durch eine 24-stündige Differenzierungs- und eine 24- bis 36-stündige Aktivierungsphase generiert. Einer zweiten Population wurde in der Differenzierungsphase zusätzlich zu GM-CSF und IL-4 das Zytokin IFN- α beigegeben. Die Aktivierung erfolgte in beiden Gruppen mit den proinflammatorischen Mediatoren IL-1 β , TNF- α und PGE₂. Nach Durchlaufen dieses Procedere wurden die DCs geerntet und gewaschen, so dass keine Zytokine mehr vorhanden waren. Eine so genannte *wash-out* Kultur wurde im Anschluss angesetzt, in der die DCs allein in DC-Medium ohne weitere Zugabe jeglicher Zytokine kultiviert wurden. Durchflusszytometrisch wurden die DCs anfangs und nach je 24 Stunden untersucht. Dargestellt ist ein repräsentativer Spender von vier.

3.2.1.2. Kapazität von IFN- α -FastDCs zur Induktion von T-Zell-Proliferation

Da die IFN- α -FastDCs nach der *wash-out* Kultur eine stabilere Reife vermuten ließen, stellte sich die Frage, ob sie auch besser geeignet sind, T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Dies wurde mit einer allogenen gemischten Lymphozytenreaktion untersucht. Nach einer 48-stündigen *wash-out* Kultur wurden beide DC-Gruppen geerntet und mit allogenen nicht-adhären Zellen (NAZ) aus der Fraktion der PBMCs inkubiert (hauptsächlich Lymphozyten). Wie man in Abbildung 10 sehen kann, waren beide DC-Gruppen, passend zu ihrem reifen Phänotyp, auch nach 48 Stunden *wash-out* in der Lage, eine effektive T-Zell-Proliferation zu induzieren. Die Zugabe von IFN- α hatte darauf keinen Einfluss.

Durch die Zugabe von IFN- α in der Differenzierungsphase ließ sich zeigen, dass IFN- α -*FastDCs* phänotypisch länger ausgereift bleiben und die gleiche Kapazität zur Induktion von T-Zell-Proliferation haben wie *FastDCs* ohne IFN- α .

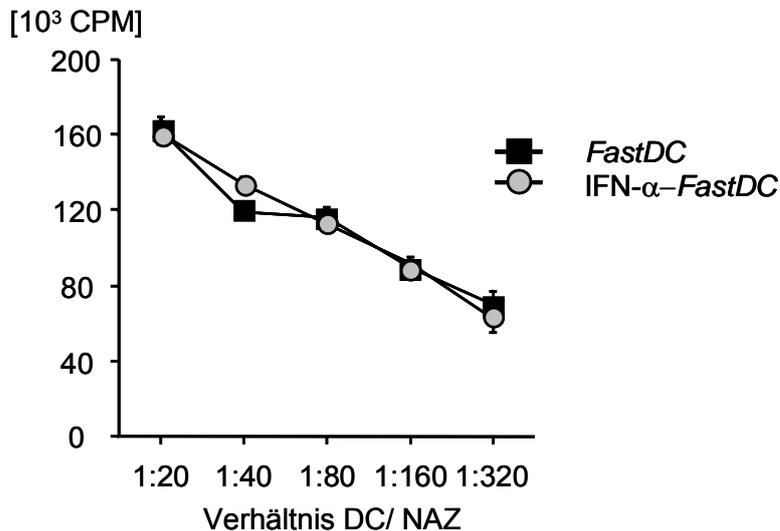


Abbildung 10: *FastDCs* und IFN- α -*FastDCs* regen beide gleichermaßen gut T-Zellen zur Proliferation an. *FastDCs* wurden entweder durch das etablierte Protokoll gewonnen oder durch die zusätzliche Gabe von IFN- α in der Differenzierungsphase. Nach einer 48 Stunden dauernden *wash-out* Kultur wurden die DCs geerntet und mit frisch isolierten, allogenen, nicht-adhärenenten Zellen aus der PBMC-Fraktion für fünf Tage inkubiert. Dabei wurden verschiedene Mischungsverhältnisse gewählt, die von 1:20 bis 1:320 reichten. Nach diesen fünf Tagen erfolgte eine 18-stündige Inkubation mit [³H]-Thymidin, bevor die Zellen auf Filterpapiere gebracht wurden. Anschließend wurden die Filter getrocknet und nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit wurde in einem β -Counter die Anzahl der *counts per minute* ermittelt. Als Kontrollwert dienten pure NAZ ohne DCs, welche einen cpm-Wert von ca. 12×10^3 ergaben. Dargestellt ist ein repräsentativer Spender von vier.

3.2.1.3. Optimale Ausreifung der IFN- α -*FastDCs*

Für die weitere Charakterisierung der *FastDCs*, bzw. für mögliche Optimierungen, wurden folgende Modifikationen des Generierungsprotokolls verwendet:

- *FastDCs* mit konventioneller Aktivierung (PGE₂, IL1- β , TNF- α)
- IFN- α -*FastDCs* mit konventioneller Aktivierung (PGE₂, IL1- β , TNF- α)
- *FastDCs* mit konventioneller Aktivierung plus IFN- γ und CD40-L
- IFN- α -*FastDCs* mit konventioneller Aktivierung plus IFN- γ und CD40-L

Alle DC-Populationen wurden anschließend über 120 Stunden ohne Zytokine weiterkultiviert (*wash-out*). Die von T-Zellen abgeleiteten Stimuli CD40-L und IFN- γ wurden für die letzten 12 bis 24 Stunden der Aktivierungsphase den DCs zugefügt (so genannte sequentielle Stimulation) und dadurch ein Kontakt mit T-Zellen simuliert. Während der *wash-out* Kultur wurden die DC-Populationen alle 24 Stunden mit der FACS-Analyse untersucht. Wie schon beschrieben, zeigte sich bei den IFN- α -*FastDCs* eine geringere Abnahme der Reifemarker und kostimulatorischen Moleküle, wobei dies am deutlichsten bei CD80 zu sehen war (Abbildung 11, $p=0,004$ IFN- α -*FastDCs* im Vergleich zu *FastDCs* nach 96 Stunden *wash-out*). Desweiteren kam es bei den IFN- α -*FastDCs* zu einem verlangsamten Anstieg des Monozytenmarkers CD14. Diese bei IFN- α -*FastDCs* beobachteten Effekte konnten durch die sequentielle Aktivierung mit CD40-L und IFN- γ noch verstärkt und somit eine optimale terminale Ausreifung erreicht werden. Damit konnten die IFN- α -*FastDCs* ihren ausgereiften Immunphänotyp bis zum Ende der *wash-out* Kultur aufrechterhalten, wie in Abbildung 11 gezeigt wird. Nach 96 Stunden ist beispielsweise die *mean fluorescence intensity* (MFI) von CD80 bei IFN- α -*FastDCs* mit CD40-L und IFN- γ im Vergleich zu *FastDCs* mit CD40-L und IFN- γ signifikant erhöht ($p=0,007$). Auch die Expression von CCR-7 erreichte die höchsten Werte im Falle der erweiterten Differenzierung mit IFN- α und der sequentiellen Aktivierung mit CD40-L und IFN- γ ($p=0,017$ für IFN- α -*FastDCs* im Vergleich zu *FastDCs* nach 96 Stunden *wash-out* Kultur, Abbildung 11).

Die Differenzierung mit GM-CSF, IL-4 und IFN- α und die anschließende Aktivierung mit IL-1 β , PGE₂, TNF- α , CD40-L und IFN- γ erbrachte also die höchste Ausbeute stabiler, ausgereifter DCs.

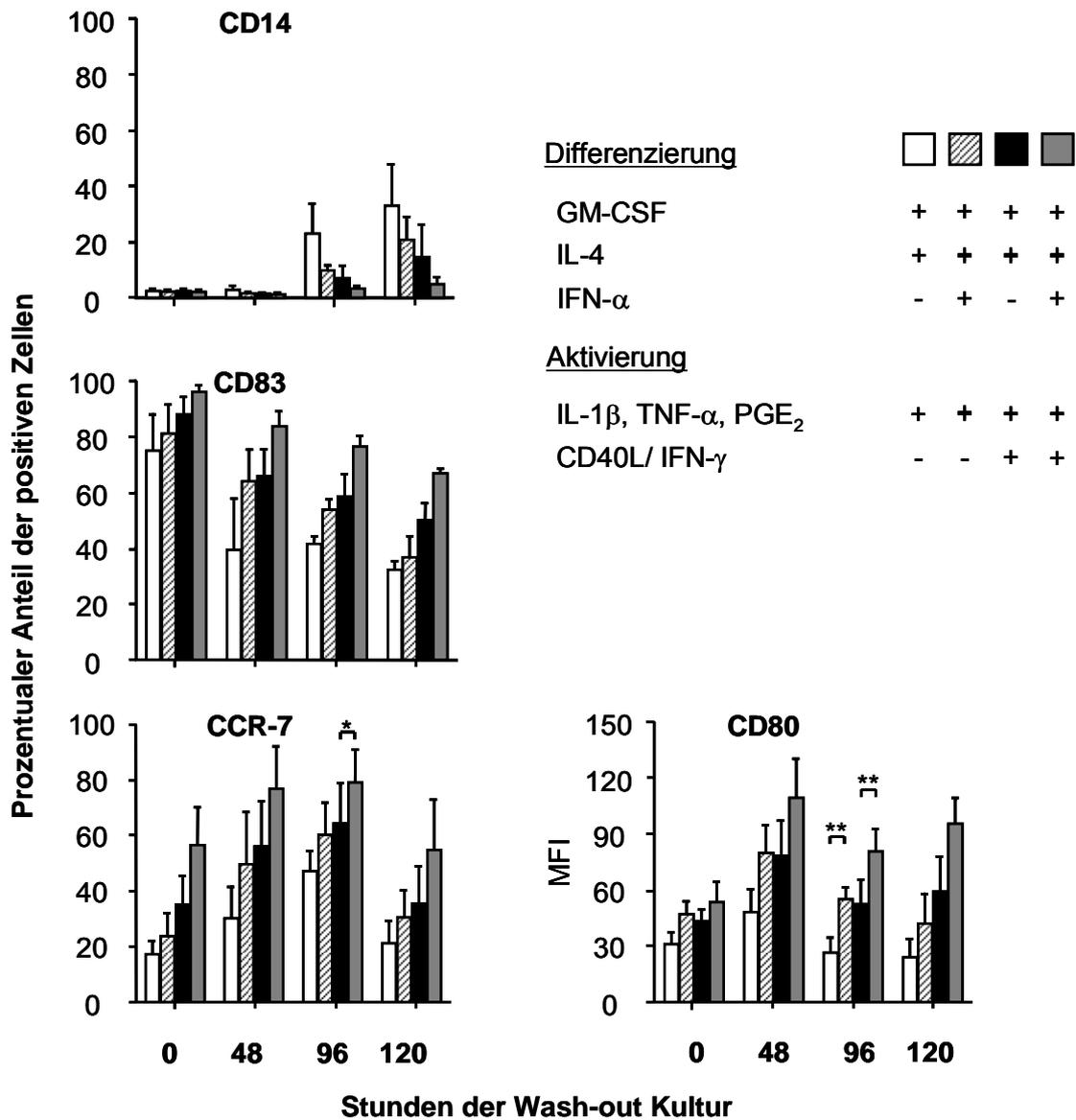


Abbildung 11: Im Vergleich zu *FastDCs* weisen *IFN- α -FastDCs* länger einen reifen Phänotyp auf, welcher durch CD40-L und IFN- γ noch gesteigert werden kann. Monozyten wurden für 24 Stunden mit GM-CSF und mit IL-4 behandelt oder zusätzlich mit IFN- α . Die darauf folgende 24- bis 36-stündige Aktivierung erfolgte mit IL-1 β , TNF- α und PGE₂ oder zusätzlich mit CD40-L und IFN- γ , wobei diese Stimuli nur für die letzten 12 bis 24 Stunden der Aktivierung zu den Zellen gegeben wurden. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in reinem DC-Medium über fünf Tage kultiviert. Die Zellen wurden täglich mit der FACS-Methode untersucht, um die Expression von Oberflächenmarkern zu bestimmen (Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM von vier Spendern, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Ferner wurde überprüft, inwieweit sich die unterschiedlich generierten DCs in der Fähigkeit unterscheiden, eine T-Zell-Proliferation anzuregen. Die verschiedenen DCs wurden mit allogenen nicht-adhären Zellen für fünf Tage in Kultur gebracht. An-

schließlich wurde die Proliferation der T-Zellen mit Hilfe des [³H]-Thymidin Proliferationsstests festgestellt. Dabei zeigte sich, dass die verschiedenen DCs alle die gleiche Kapazität zur Induktion von T-Zell-Proliferation besaßen (Abbildung 12).

Phänotypische Ausreifung ist bei DCs also nötig, jedoch nicht allein ausschlaggebend für die Aktivierung allogener T-Zellen.

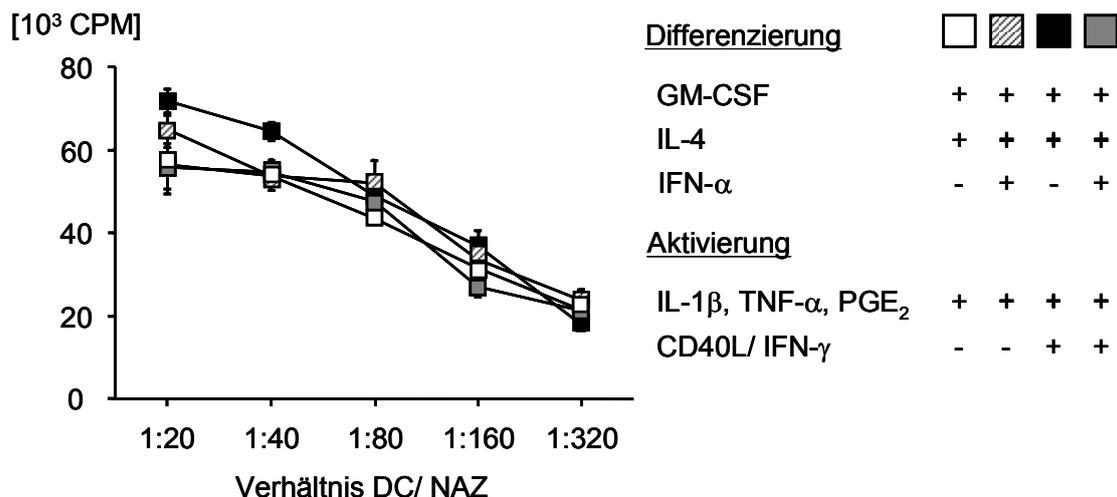


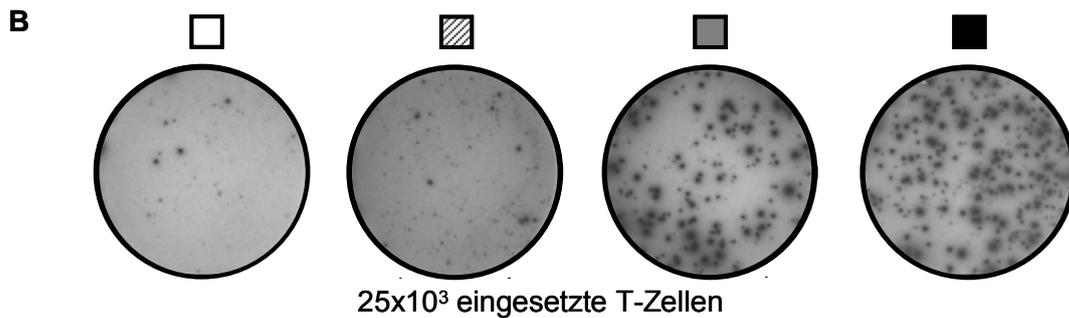
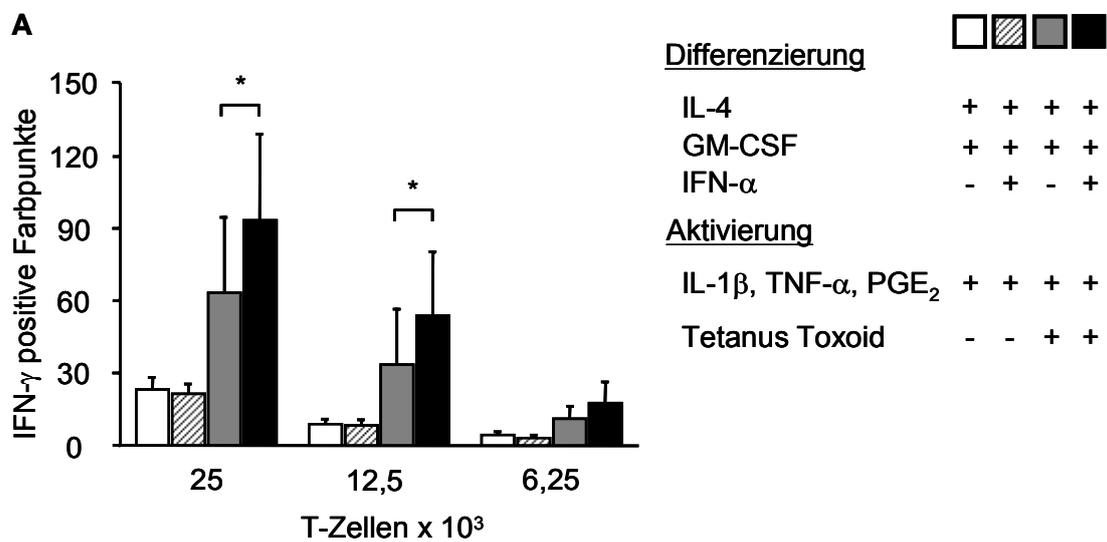
Abbildung 12: Die T-Zell-Proliferation wird durch die veränderten Generierungsprotokolle nicht beeinflusst. Wie unter 3.2.1.3. beschrieben, wurden verschiedene DCs generiert und anschließend mit allogenen nicht-adhärenenten Zellen der PBMC Fraktion für fünf Tage in verschiedenen Mischungsverhältnissen kokultiviert. In einer gemischten Lymphozytenreaktion wurde die T-Zell-Proliferation mit [³H]-Thymidin gemessen. Es zeigte sich in Bezug auf die T-Zell-Proliferation kein Unterschied zwischen den verschiedenen DC Populationen. Als Kontrolle dienten reine NAZ ohne DC Kontakt, die etwa 2×10^3 cpm lieferten. Dargestellt ist ein repräsentativer Spender von vier.

3.2.2. Hervorrufen einer T_H1-Immunantwort durch IFN-α-FastDCs

Nachdem sich gezeigt hatte, dass IFN-α-FastDCs eine erhöhte Reifemarkerexpression aufweisen, jedoch den FastDCs in der Induktion zur Proliferation alloreaktiver T-Zellen nicht überlegen sind, wurde ihre Kapazität zur Aktivierung Antigen-spezifischer IFN-γ produzierender T-Zellen untersucht. Dafür wurden autologe CD3⁺ T-Zellen (pan-T-Zellen) aus der nicht-adhärenenten Fraktion der PBMCs mit der MACS-Methode isoliert. FastDCs und IFN-α-FastDCs wurden entweder mit dem Antigen Tetanustoxoid (TT) beladen oder nicht beladen, bevor die Stimulation mit den proinflammatorischen Mediatoren erfolgte. Danach wurden sie mit T-Zellen für eine Woche kokultiviert. Nach Ablauf der Inkubation wurden die T-Zellen mit denselben, frisch isolierten DCs restimu-

liert, und die IFN- γ Produktion der T-Zellen wurde mit der ELISPOT-Methode gemessen. Aus den Überständen der frischen Kokulturen und nach Restimulation wurden die Zytokine mit ELISA bestimmt.

Es zeigte sich ein Anstieg bei der IFN- γ Produktion von autologen CD3⁺ T-Zellen, wenn IFN- α -*FastDCs* statt *FastDCs* zur Induktion verwendet wurden (Abbildung 13 A, B). Da zu keinem Zeitpunkt IL-4, jedoch IFN- γ in den Kokulturen nachgewiesen werden konnte, ist anzunehmen, dass sowohl IFN- α -*FastDCs* als auch *FastDCs* in der Lage sind eine Immunantwort vom Typ T_H1 hervorzurufen (Abbildung 13C).



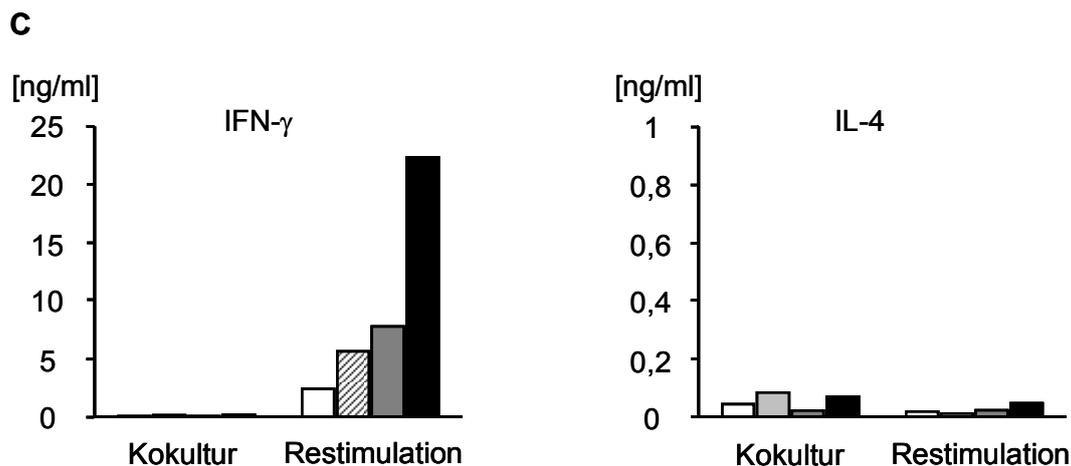


Abbildung 13: Die zusätzliche Ausdifferenzierung mit IFN- α bewirkt die Induktion einer T_H1-gewichteten Immunantwort gegen das Antigen TT. *FastDCs* und IFN- α -*FastDCs* wurden mit dem Antigen Tetanustoxoid beladen und mit autologen CD3⁺ T-Zellen kokultiviert. Unbeladene IFN- α -*FastDCs* und *FastDCs* dienten als Kontrolle. Nach einer Woche wurden die T-Zellen mit denselben, frisch isolierten DCs restimuliert. Die Anzahl der IFN- γ produzierenden T-Zellen wurde bei den drei verschiedenen eingesetzten T-Zell-Zahlen (6,25, 12,5 und 25 x 10³) aus Triplikaten mit einem automatischen ELISPOT-Lesegerät ermittelt. **A:** Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM von vier Spendern, * $p < 0,05$. **B:** Original Bilder aus der ELISPOT-Platte eines repräsentativen Spenders. **C:** Die Überstände aus der Kokultur wurden 48 Stunden nach Beginn und 48 Stunden nach Restimulation an Tag 7 entnommen und mit ELISA untersucht (Ein repräsentativer Spender von insgesamt vier ist dargestellt).

Die in A dargestellte Zuordnung der Säulen gilt auch für Abbildung B und C.

3.2.3. Priming naiver T-Zellen durch IFN- α -*FastDCs*

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, inwieweit *FastDCs* und IFN- α -*FastDCs* naive T-Zellen auf ein Antigen *primen* können. Dazu wurden mit der MACS-Methode autologe CD3⁺CD45RA⁺ naive T-Zellen aus der nicht-adhärenen Fraktion der PBMCs isoliert und mit reifen *FastDCs* und IFN- α -*FastDCs* eine Woche kokultiviert. Beide DC-Populationen waren entweder mit dem Antigen TT beladen oder unbeladen. Nach dem siebten Tag wurden die Kokulturen in den ELISPOT-Platten restimuliert. Zur Restimulation wurden ausschließlich mit TT beladene oder unbeladene *FastDCs* und keine IFN- α -*FastDCs* verwendet, um einen möglichen Effekt auf das *priming* nicht zu maskieren. Wie man in Abbildung 14 sehen kann, gab es keinen Hinweis darauf, dass sich IFN- α -*FastDCs* besser zum *primen* naiver T-Zellen eignen.

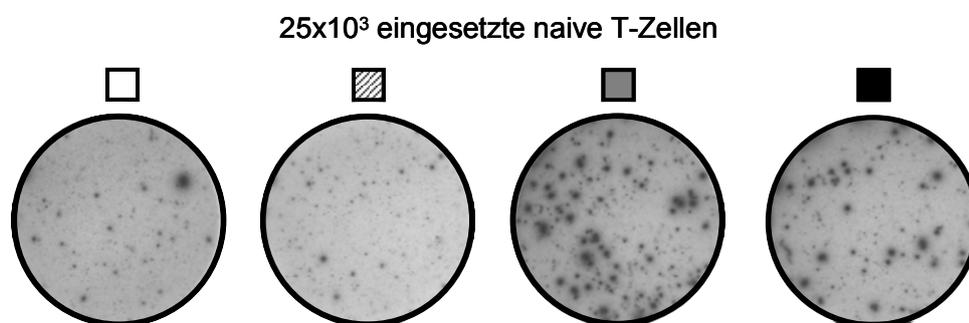
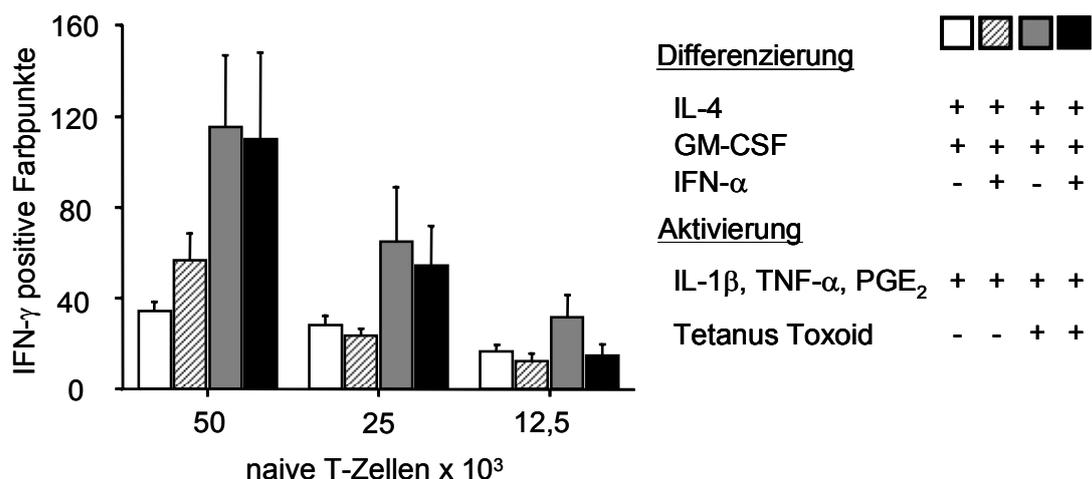


Abbildung 14: IFN- α -FastDCs bewirken kein besseres *priming* naiver T-Zellen als *FastDCs*. *FastDCs* und IFN- α -*FastDCs* wurden mit TT beladen oder blieben unbeladen und wurden dann mit autologen naiven T-Zellen kokultiviert. Die T-Zellen wurden nach einer Woche in ELISPOT Platten mit frisch isolierten, TT beladenen oder unbeladenen *FastDCs* ohne IFN- α restimuliert. Die Anzahl der IFN- γ sezernierenden T-Zellen wurde aus Triplikaten mit einem automatischen ELISPOT-Lesegerät ermittelt (**Oben**: Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM von vier Spendern; **Unten**: Original-Bilder der ELISPOT-Platte eines repräsentativen Spenders).

3.2.4. Das Zytokinprofil von *FastDCs* und IFN- α -*FastDCs*

Für die Aktivierung von T-Zellen ist die Produktion immunregulatorischer Zytokine durch DCs ein wesentlicher Faktor. Wie schon bekannt, sezernieren *FastDCs*, die mit den von uns verwendeten proinflammatorischen Zytokinen aktiviert wurden, nur sehr geringe Mengen des biologisch wirksamen IL-12(p70), was auch durch die Zugabe von CD40-L und IFN- γ nicht gesteigert werden konnte [Dauer, 2003a]. Ergänzend dazu wurde nun untersucht, ob die Zytokinproduktion von IFN- α -*FastDCs* der von *FastDCs* entspricht oder verändert ist.

Wie Abbildung 15A zeigt, wurden bei IFN- α -*FastDCs* im Vergleich zu *FastDCs* geringere Menge an gesamten IL-12, bestehend aus den Homo- und Heterodimeren p40 und p70, nachgewiesen. Auch die Produktion von biologisch aktivem IL-12(p70), ein Heterodimer aus den Untereinheiten p35 und p40, wurde durch IFN- α nicht verbessert und war fast nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Passend zu dem Fehlen von nachweisbarem IL-12(p70) konnte auch in keiner der beiden DC-Präparationen die Expression von IL-12(p35) mRNA gefunden werden (Abbildung 15B).

Trotz des Mangels an IL-12(p70), ein „Schlüssel-Zytokin“ für die Induktion einer T_H1-Immunantwort [Kalinski, 2001], konnte in den vorherigen Experimenten gezeigt werden, dass IFN- α -*FastDCs* in der Lage sind, eine Antigen-spezifische Immunreaktion vom Typ T_H1 hervorzurufen und möglicherweise eine verstärkte Antwort von T-Gedächtniszellen bewirken. Zudem können sie, wie *FastDCs*, Antigen-spezifische zytotoxische T-Zellen induzieren, die zur effektiven Lyse von Zielzellen fähig sind [Dauer, 2006]. Es wurden noch weitere Zytokine untersucht, die bekannt dafür sind, eine T_H1- (IL-18), T_H2- (IL-10), T-Gedächtniszellen- (IL-18, IL-23) oder zytotoxische (IL-15) Immunantwort hervorzurufen. Mit der RT-PCR wurde in beiden DC-Populationen die mRNA-Expression von IL-18 und der Untereinheit (p19) von IL-23 untersucht. Jedoch war bis auf eine spenderabhängige Variabilität kein klarer Unterschied in den Expressionsmustern der Zytokine zu finden (Abbildung 15B).

Abschließend sei noch erwähnt, dass nur vernachlässigbar geringe Mengen an IL-10 und IL-15 Protein, wichtige Zytokine für die Induktion von T_H2-Zellen und CTLs, in den Überständen der beiden DCs nachgewiesen wurden (Daten nicht gezeigt).

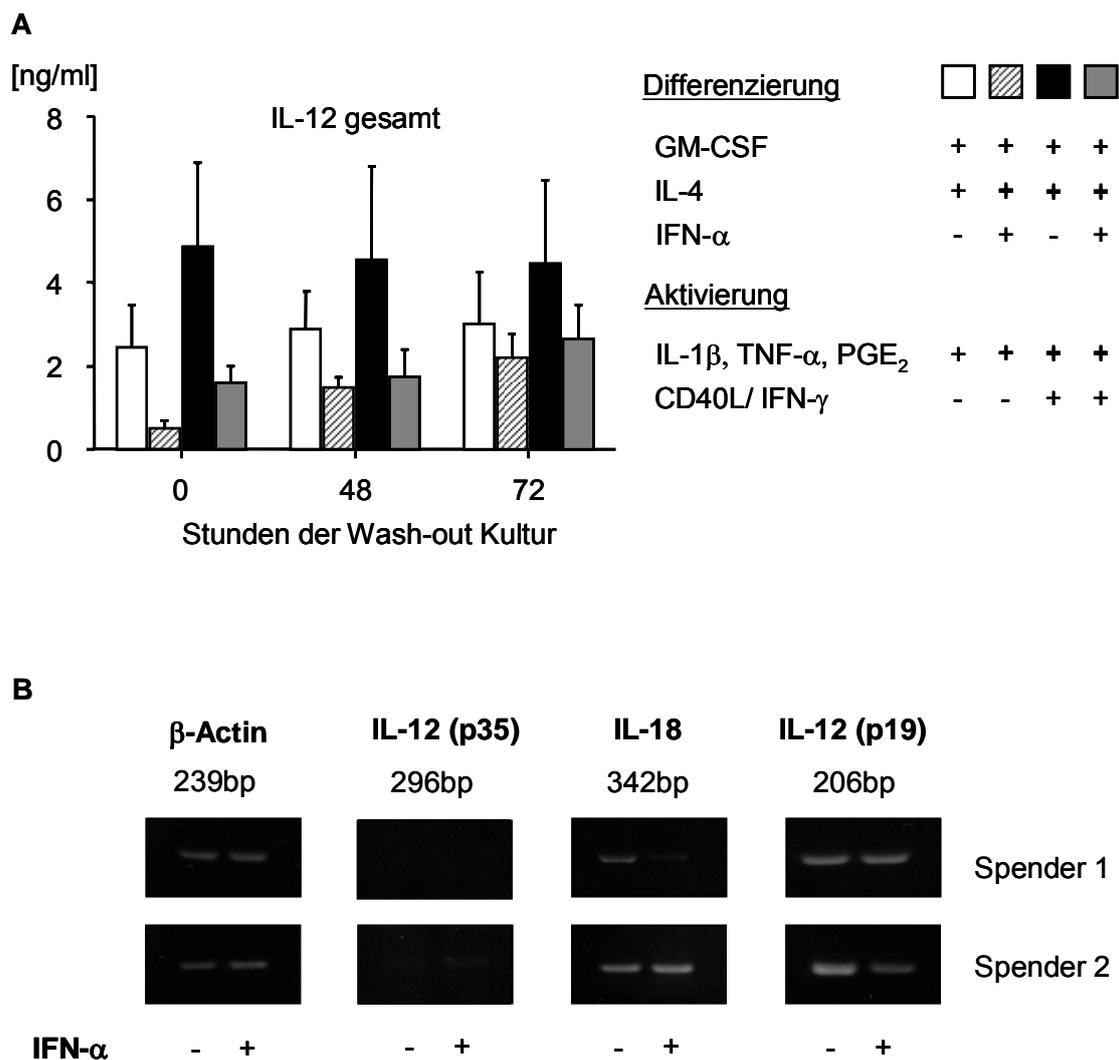


Abbildung 15: IFN- α -FastDCs sezernieren vermindert IL-12. *FastDCs* und IFN- α -*FastDCs* wurden generiert. In der oberen Abbildung **A** wurden die gekennzeichneten DCs sequentiell mit CD40-L und IFN- γ aktiviert. Die Überstände wurden sofort nach abgeschlossener Ausreifung (Zeitpunkt 0) und nach 48 bzw. 72 Stunden *wash-out* Kultur entnommen und mit der ELISA-Methode untersucht. **A**: Daten zeigen die Mittelwerte \pm SEM von vier Spendern.

B: Aus IFN- α -*FastDCs* und *FastDCs* wurde zum Zeitpunkt 0 die gesamt-RNA isoliert und mit RT-PCR die Expression der Zytokin-mRNAs untersucht. Die Ergebnisse von zwei Spendern von insgesamt sieben sollen die spenderabhängige Abweichung im Muster der Zytokin-mRNA-Expression in herkömmlichen und mit IFN- α generierten DCs veranschaulichen. Als Kontrolle und Referenz diente die Expression von β -Aktin-mRNA.

4. Diskussion

4.1. Übersicht über die experimentellen Befunde

Erstmalig wurde in dieser Arbeit ein direkter Vergleich zwischen moDCs, die nach einem siebentägigen Protokoll generiert wurden und den von unserer Arbeitsgruppe etablierten *FastDCs* hinsichtlich der Induktion Tumorantigen-spezifischer CTLs durchgeführt. Dabei zeigten sich die *FastDCs* den moDCs ebenbürtig. Bei der Verwendung des *FastDC*-Protokolls zeigte sich jedoch, dass sowohl die Ausbeute als auch die Reinheit dieser DCs im Vergleich zum Standard-Protokoll höher war. Für die Induktion von Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen erwiesen sich *FastDCs* als genauso geeignet wie moDCs. Auch die Zahl der Antigen-spezifischen, IFN- γ produzierenden CD8⁺ T-Zellen war unabhängig vom DC-Generierungsprotokoll. Bei der ELISPOT-Analyse und weiteren Zytokinmessungen stellte sich heraus, dass die Kokultur von autologen T-Zellen mit *FastDCs* eine T_H1-gewichtete Immunantwort gleicher Quantität und Spezifität hervorrief wie die Kokultur mit moDCs. Zytotoxische T-Zellen kokultiviert mit Melan-A-beladenen *FastDCs* zeigten wie ihre Vergleichspartner aus den Peptid-beladenen moDC-Kulturen eine hohe Spezifität für ihr Antigen, hatten aber zudem eine höhere lytische Aktivität gegen Melan-A-tragende Zielzellen.

Für eine eventuell mögliche Optimierung der *FastDCs*, wurde das Protokoll durch Zugabe von IFN- α in der Differenzierungsphase modifiziert. IFN- α in Verbindung mit IL-4 und GM-CSF wirkte sich positiv auf Überleben und Reife der *FastDCs* aus und führte zu keiner Veränderung ihrer allostimulatorischen Kapazität zur T-Zell-Proliferation in der MLR. Auch das *priming* naiver T-Zellen war unabhängig davon, ob man *FastDCs* oder IFN- α -*FastDCs* verwendete. Beide DCs zeigten die Fähigkeit zur Induktion einer selektiven Immunantwort vom Typ T_H1. Optimale Ausreifung und stabiles Überleben der *FastDCs*, ohne Rückumwandlung zu Monozyten-/Makrophagen-ähnlichen Vorstufen, wurde durch den Zusatz von IFN- α zu IL-4 und GM-CSF während der Differenzierung und anschließender sequentieller Stimulation mit proinflammatorischen Mediatoren und den T-Zell-abhängigen Stimuli CD40-L und IFN- γ erreicht.

4.2. Ergebnisinterpretation im Vergleich mit der Literatur

4.2.1. Induktion einer Antigen-spezifischen Immunantwort mit *FastDCs*

4.2.1.1. Bisherige Kenntnisse zur Generierung dendritischer Zellen

Es ist bekannt, dass aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes gesunder Spender dendritische Zellen generiert werden können [Romani, 1994]. Verschiedene Arbeitsgruppen haben unterschiedliche Protokolle zur Generierung ausgereifter DCs entwickelt, die beispielsweise aus einer fünf- bis siebentägigen Inkubation mit IL-4 und GM-CSF für die Differenzierung vom Monozyten zur unreifen DC und einer darauf folgenden Aktivierung zur reifen DC bestehen. Die Stimulation wird für weitere ein bis drei Tage durchgeführt und kann mit proinflammatorischen Zytokinen, mikrobiellen oder durch T-Zellen vermittelten Stimuli erfolgen [Caux, 1992; Feuerstein, 2000; Romani, 1994; Sallusto und Lanzavecchia, 1994]. Schuler et al. haben vor einigen Jahren eine Methode eingeführt, die sie als „Standard“ bezeichnen. Sie beschreibt die Differenzierung von CD14⁺ Monozyten zu DCs durch Inkubation mit IL-4 und GM-CSF und der Aktivierung mit IL-1 β , PGE₂, TNF- α und IL-6 [Schuler, 2003]. Unsere Arbeitsgruppe konnte jedoch zeigen, dass IL-6 bei der Aktivierung von DCs keine tragende Rolle spielt [Dauer, 2003a], weswegen es im Weiteren für die DC-Generierung nicht mehr verwendet wurde. Verschiedene Arbeitsgruppen beschäftigten sich damit, die relativ lang dauernde DC-Generierung von mindestens einer Woche auf wenige Tage zu verkürzen. Dabei wurden unterschiedliche Protokolle verwendet, wie beispielsweise transendotheliale-Migration und Inkubation mit Calcium-Ionophor oder mit GM-CSF und zusätzlichen Zytokinvariationen [Czerniecki, 1997; Faries, 2001; Randolph, 1998; Xu, 2003]. Keine der Arbeitsgruppen verglich jedoch diese DCs mit herkömmlichen moDCs. Auch unsere Arbeitsgruppe befasste sich mit der Verkürzung des moDC-Protokolls und konnte zeigen, dass sich innerhalb von 48 Stunden phänotypisch ausgereifte DCs generieren lassen [Dauer, 2003a]. Diese *FastDCs* konnten Antigen aufnehmen und prozessieren, IL-12 produzieren und besaßen die Kapazität zur Stimulation von Antigen-spezifischer T-Zell-Proliferation [Dauer, 2003a]. Es fehlte jedoch bis jetzt der direkte Nachweis, dass *FastDCs* in der Lage sind, Antigen-spezifische CTLs zu induzieren, die ihre Zielzellen effektiv lysieren können.

4.2.1.2. Stimulation einer Tumorantigen-spezifischen Immunantwort

Um die Kapazität von *FastDCs* und *moDCs* bezüglich der Induktion Tumorantigen-spezifischer zytotoxischer T-Zellen zu vergleichen, wurde das Modell-Peptid Melan-A gewählt. Es ist ein Peptid, das von dem Melanom-assoziierten Differenzierungsantigen Melan-A/MART-1 abstammt [Valmori, 1998].

Es wurden insgesamt drei unabhängige Endpunkte ausgewählt, um die Tumorantigen-spezifische zytotoxische T-Zell-Antwort nachzuweisen:

- Bindung von Antigen-spezifischen T-Zellen an fluoreszenzmarkierte MHC-I/Melan-A-Komplexe (Streptamere)
- Intrazelluläre Färbung von IFN- γ in zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen (FACS-Analyse)
- Nachweis der Sekretion von IFN- γ der T-Zellen (ELISPOT).

Jede einzelne dieser Methoden ist etabliert und wurde schon von verschiedenen Arbeitsgruppen eingesetzt, um eine Antigen-spezifische, von T-Zellen vermittelte Immunantwort *in vitro* zu überwachen und zu quantifizieren [Altman, 1996; Asai, 2000; Clay, 2001; Kalyuzhny und Stark, 2001]. Die einzelnen Methoden korrelieren meist gut miteinander, unterscheiden sich aber hinsichtlich der nachgewiesenen Anzahl Antigen-spezifischer T-Zellen. Mehrfach wurde beschrieben, dass die Bindung an MHC-I-Peptid-Komplexe am sensitivsten ist und damit drei- bis fünffach mehr Antigen-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden können als durch ELISPOT oder intrazelluläre Zytokinfärbung. [Clay, 2001; Lysterly, 2003; Sun, 2003; Tan, 1999]. Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit stimmen damit überein. Bei der FACS-Analyse der Streptamerbindung wurde ein etwa dreifach größerer Prozentsatz Melan-A-spezifischer CD8⁺ T-Zellen detektiert als mit der intrazellulären IFN- γ -FACS-Analyse. Der niedrigste Anteil IFN- γ produzierender T-Zellen wurde im ELISPOT gefunden. Dazu passend wurde von Kuzushima et al. beschrieben, dass der ELISPOT-Test weniger sensitiv im Nachweis IFN- γ spezifischer T-Zellen ist als die FACS-Analyse intrazellulärer Zytokine [Kuzushima, 1999].

4.2.1.3. Induktion Antigen-spezifischer zytotoxischer T-Zellen durch *FastDCs*

Durch eine Kokultur von Melan-A-beladenen *FastDCs* oder moDCs mit autologen CD3⁺ T-Zellen war es möglich, Melan-A-spezifische CTLs zu induzieren. In dem ⁵¹Cr-Zytotoxizitätstest zeigte sich, dass die CTLs aus der Kokultur mit Peptid-beladenen *FastDCs* besser in der Lage waren, mit Melan-A beladene T2-Zellen zu lysieren, als CTLs aus Kokulturen mit moDCs. Dieser Effekt war am deutlichsten in dem niedrigsten Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen (20:1) zu sehen. Dass es sich hierbei nicht um unspezifische Lyse handelte, konnte anhand der geringeren Lyseraten der mit dem irrelevanten Peptid HIV-Pol-beladenen T2-Zellen nachgewiesen werden. Verunreinigungen der Kokulturen mit anderen Effektorzellen wie natürlichen Killerzellen oder unspezifischen T-Zellen konnten durch die FACS-Analyse ausgeschlossen werden. Für eine mögliche Erklärung dieser besseren CTL-Induktion wurden die von den DCs produzierten Zytokine untersucht. In den Überständen der *FastDCs* wurden, im Vergleich zu moDCs, leicht erhöhte Mengen an IL-18 nachgewiesen, ein Zytokin, welches synergistisch mit IL-12 die Immunantwort in Richtung T_H1 Typ lenken kann [Nakanishi, 2001; Stoll, 1998]. Interessanterweise war die Produktion von biologisch wirksamem IL-12(p70) zwar insgesamt sehr niedrig, aber bei den *FastDCs* beinahe doppelt so hoch wie in den vergleichbaren moDCs. Wie schon beschrieben, ist IL-12(p70) ein sehr wichtiges Zytokin zur Induktion einer T_H1-gewichteten Immunantwort [Gately, 1998; Trinchieri, 1998; van Seventer, 2002]. Xu et al. haben vor einigen Jahren verschiedene *FastDC*-Protokolle zur Generierung von DCs aus Monozyten miteinander verglichen. Über Nacht inkubierten sie Monozyten mit GM-CSF und reiften sie für weitere 14 bis 20 Stunden entweder mit IFN- γ , TNF- α und CD40-L zu so genannten „DC1“ oder mit IL-4, IFN- α , PGE₂ und CD40-L zu so genannten „DC2“ aus [Xu, 2003]. In Anlehnung an die empfohlenen Zytokine von Jonuleit et al. [Jonuleit, 2001] wurden zusätzlich „CMM-DCs“ generiert (12-stündige Inkubation mit IL-4 und GM-CSF und 14- bis 20-stündige Aktivierung mit IL-1 β , TNF- α , PGE₂ und IL-6) [Xu, 2003], ein Protokoll, das dem unserer *FastDCs* vergleichbar ist. Im Gegensatz zu unseren Untersuchungen zeigten jedoch Xu et al., dass nicht „CMM-DCs“ sondern nur „DC1“ die Fähigkeit besaßen, größere Mengen des biologisch wirksamen IL-12(p70) zu produzieren und so in der Lage waren, die lytische Kapazität Antigen-spezifischer CD8⁺ CTLs und deren IFN- γ Produktion merklich zu steigern [Dauer, 2003a; Xu, 2003]. Da sowohl in *FastDCs* als auch in moDCs insgesamt nur sehr geringe Mengen an IL-12(p70) nachgewiesen wurden, kann davon ausgegangen werden, dass selbst die Verdopplung der produzierten Men-

ge wie bei den *FastDCs* nicht ausreicht, um eine biologische Wirkung zu entfalten. Dennoch spricht eindeutig für die Verwendung von *FastDCs*, dass durch sie höhere lytische Aktivität von Antigen-spezifischen CTLs induziert wird. Die zugrunde liegenden Mechanismen bleiben jedoch derzeit noch unbekannt.

4.2.1.4. Vorteile durch die verbesserte Ausbeute und Reinheit der *FastDCs*

In den vorliegenden Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass die Verwendung des *FastDC*-Protokolls eine höhere DC-Ausbeute ergibt als das 7-Tage Standard-DC Protokoll [Obermaier, 2003]. In den zwei Tagen des *FastDC*-Protokolls ließen sich von den eingesetzten Monozyten etwa 20% mehr in phänotypisch ausgereifte DCs umwandeln, als in den sieben Tagen des Standardprotokolls. Eine vorherige Beladung unreifer DCs mit Antigen, eine wiederholte Gabe von Wachstumsfaktoren oder eine längere Aktivierung der moDCs hatten keinen Einfluss auf diesen Befund. Außerdem konnte durch das *FastDC*-Protokoll eine höhere Reinheit der DC-Präparationen erreicht werden. Anhand dieser Befunde wird erkennbar, dass man mit dem *FastDC*-Protokoll in wesentlich kürzerer Zeit reife DCs mit höherer Reinheit und Ausbeute generieren kann als bisher. Es können damit nicht nur Zeit und Kosten eingespart werden, sondern es genügen auch geringere Mengen peripheren Blutes, um dieselbe Ausbeute wie mit dem Standardprotokoll zu erreichen. Das ist in der Immuntherapie maligner Tumore ein wichtiger Punkt, da Patienten mit fortgeschrittenen malignen Erkrankungen oft auch an Anämie leiden. Weitergedacht wäre es möglich, dass die Verwendung des *FastDC*-Protokolls die Generierung von DCs in weitgehend geschlossenen „Zell-Fabriken“ [Berger, 2002; Tuyaerts, 2002] vereinfachen und die Gefahr von Kontaminationen der *in vitro* Kulturen durch die verkürzte Zeit minimieren würde. Es wäre theoretisch denkbar, in diesen „Zell-Fabriken“ Monozyten durch eine einmalige gemeinsame Gabe von Wachstumsfaktoren, wie IL-4 und GM-CSF, Antigen und proinflammatorischen Molekülen innerhalb von 48 Stunden zu reifen, Antigen-beladenen DCs auszureifen [Obermaier, 2003].

4.2.2. Modifikation des *FastDC*-Protokolls

4.2.2.1. Effekte von IFN- α auf *FastDCs*

Wie schon ausführlich erläutert, konnten durch das *FastDC*-Protokoll ausgereifte DCs mit voller Kapazität zur Stimulation von T-Zellen generiert werden [Dauer, 2003a], die zudem effektiv Antigen-spezifische CTLs induzieren können. Unabhängig davon wurde in verschiedenen anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen, dass man in kurzer Zeit phänotypisch ausgereifte DCs erhält, wenn man Monozyten mit GM-CSF und IFN- α statt mit IL-4 und GM-CSF inkubiert [Della Bella, 2004; Paquette, 1998; Santini, 2000]. Es wurde gezeigt, dass die mit IFN- α und GM-CSF generierten DCs besser Antigen-spezifische CD8⁺ CTLs gegen virale oder Tumor-spezifische Antigene induzieren konnten [Gabriele, 2004; Padovan, 2002; Santodonato, 2003]. Angesichts dieser Befunde stellte sich uns die Frage, ob sich das *FastDC*-Protokoll durch IFN- α noch optimieren ließe. Aus Versuchen unserer Arbeitsgruppe war bekannt, dass sich weder moDCs noch *FastDCs* durch IFN- α und GM-CSF alleine ausreifen ließen, sondern auf die Anwesenheit von IL-4 angewiesen waren, um ihren charakteristischen DC-Phänotyp und ihr Zytokinmuster auszuprägen [Dauer, 2003b; Dauer, 2006]. Aus diesem Grund wurden nun die *FastDCs* mit IL-4, GM-CSF und IFN- α ausdifferenziert. Es zeigte sich, dass zusätzliches IFN- α zu einer stabileren Reife der DCs führte. Die IFN- α -*FastDCs* exprimierten äußerst geringe Mengen des Monozytenmarkers CD14 und zeigten eine hohe Expression von CD83, kostimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86, Antigen präsentierenden Molekülen wie MHC-II, sowie von CCR-7 [Banchereau, 2000; Bender, 1996]. Durch Aktivierung mit proinflammatorischen Zytokinen und zusätzlicher Stimulation mit den von T-Zellen abgeleiteten Stimuli CD40-L und IFN- γ kam es zu einer weiteren Optimierung des *FastDC*-Protokolls. Die DCs blieben über einen langen Zeitraum stabil, und eine Rückumwandlung in Monozyten-/Makrophagen-ähnliche Vorstufen wurde unterdrückt. Bei der funktionellen Untersuchung mit der allogenen gemischten Lymphozytenreaktion nach fertiger Ausreifung und nach 48 Stunden *wash-out* Kultur erwiesen sich die IFN- α -*FastDCs* den *FastDCs* gleichwertig. Im Widerspruch dazu beschrieben Paquette et al. bei 7-Tage-IFN- α -DCs eine verbesserte Kapazität zur Proliferation allogener T-Zellen [Paquette, 1998]. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte sein, dass Paquette et al. eine vielfach höhere Menge an IFN- α zur Generierung eingesetzt haben oder Unterschiede zu den verwendeten Typ-I-

Interferonen bestehen [Paquette, 1998]. Da man aber insgesamt mit zwei vollständig unterschiedlichen Generierungs-Protokollen gearbeitet hat, bleibt die Vergleichbarkeit beider Protokolle grundsätzlich fragwürdig. Auch unsere Arbeitsgruppe hat in Anlehnung an Paquette et al. [Paquette, 1998] Versuche mit größeren IFN- α Mengen zur moDC-Generierung durchgeführt, jedoch nur ein vermindertes Überleben der Zellen feststellen können.

4.2.2.2. Verhalten der *FastDCs* in der *wash-out* Kultur

Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde beschrieben, dass für das erfolgreiche Auslösen einer T-Zell-spezifischen Immunantwort vollständig ausgereifte DCs nötig sind [Bender, 1996; Reddy, 1997; Romani, 1996; Sallusto und Lanzavecchia, 1994]. Vollständig ausgereifte DC müssen verschiedene Anforderungen erfüllen wie z.B. die stabile Expression von Reifemarkern und das Überleben in einer ein- bis zweitägigen *wash-out* Kultur [Bender, 1996; Romani, 1996; Thurner, 1999]. Wie die verwendeten Zytokine und Aktivierungssignale die terminale Ausreifung und das Überleben der DCs über einen längeren Zeitraum beeinflussen, wurde aber bis jetzt noch nicht genau analysiert. Nur bei Feuerstein et al., die sich vor allem mit einer optimalen Methode zum Einfrieren Antigen-beladener DCs für den klinischen Einsatz befasst haben, sind Daten über das Verhalten von DCs in einer längeren *wash-out* Kultur zu finden [Feuerstein, 2000]. Feuerstein et al. generierten frische DCs innerhalb von sieben Tagen. Nach vier Tagen *wash-out* Kultur zeigten sie eine Überlebensrate von etwa 30%. Im Gegensatz dazu erreichten die von uns verwendeten *FastDCs* und IFN- α -*FastDCs* nach vier Tagen Kultivierung ohne Zytokine eine Überlebensrate von 60-70%. Auch bei der Expression der Reifemarker zeigten sich Unterschiede. Während die DCs von Feuerstein et al. auch nach einem dreitägigen *wash-out* einen unverändert reifen Phänotyp mit minimaler CD14 Expression aufwiesen [Feuerstein, 2000], zeigten unsere *FastDCs* ab dem vierten Tag der *wash-out* Kultur einen verminderten Reifestatus, der durch eine wieder vermehrt auftretende CD14-Expression und einen Rückgang der CD83-Expression charakterisiert war. Zusammenfassend kann man feststellen, dass sich die *FastDCs* auch nach Entzug der Zytokine als sehr stabil erwiesen, jedoch trotz Aktivierung mit den von Schuler et al. [Schuler, 2003] als optimal definierten Stimuli nur temporär ausgereift blieben. Die Zugabe von IFN- α bei der *FastDC*-Generierung führte in der *wash-out* Kultur über einen längeren Zeitraum zu einem reifen Phänotyp. Dieser

Effekt war besonders deutlich zu sehen, wenn die DCs zusätzlich sequentiell mit CD40-L und IFN- γ stimuliert wurden.

4.2.2.3. Stimuli zur terminalen Ausreifung von *FastDCs*

Die Beobachtung, dass sich *FastDCs* nach gewisser Zeit in der *wash-out* Kultur von einem reifen in einen Monozyten-ähnlichen Phänotyp zurückverwandeln, veranschaulicht, dass temporäre Reife nicht gleichzusetzen ist mit einer stabilen terminalen Ausreifung. Es ist bekannt, dass die Interaktion mit CD40-L auf T-Zellen bei DCs zu einem ausgereiften Phänotyp mit besserem Überleben führt [Caux, 1994; Feuerstein, 2000]. In Übereinstimmung damit konnten auch wir eine höhere Überlebensrate und eine stabilere Ausreifung der *FastDCs* nach zusätzlicher Aktivierung mit CD40-L und IFN- γ nachweisen. Sowohl CD40-L als auch IFN- γ sind für eine suffiziente IL-12 Produktion in DCs unabdingbar [Snijders, 1998], und so mitverantwortlich für das Auslösen einer DC-induzierten T_H1-gewichteten T-Zell-Antwort. Dieser Effekt tritt unabhängig von phänotypischer Reife auf [Lapointe, 2000; Mailliard, 2004; Vieira, 2000]. Bezüglich der Zytokinproduktion ist bekannt, dass in ausgereiften DCs die Fähigkeit zur IL-12(p70) Produktion nur für wenige Stunden nach Aktivierung durch CD40-L und IFN- γ gesteigert werden kann [Kalinski, 1999]. Innerhalb dieses Zeitintervalls sind diese von T-Helferzellen stammenden Stimuli jedoch von sehr großer Bedeutung für das Überleben, die Reife und das Muster der Zytokinproduktion der DCs und können somit die darauf folgende Immunantwort beeinflussen [Langenkamp, 2000; Luft, 2002].

In den *wash-out* Kulturen konnten auch wir beobachten, dass die alleinige Aktivierung mit proinflammatorischen Mediatoren nur zu einer vorübergehenden Ausreifung der *FastDCs* führte. Nach zusätzlichem Kontakt mit CD40-L und IFN- γ blieb jedoch sowohl die Expression von Reifemarkern als auch die IL-12 Produktion über mehrere Tage relativ stabil. Deshalb ist anzunehmen, dass der Kontakt zu T-Helferzellen für die terminale Differenzierung der DCs unerlässlich ist. Weiter konnte gezeigt werden, dass man durch Zugabe von IFN- α phänotypisch reife DCs generieren konnte, die nach zusätzlicher Aktivierung durch CD40-L und IFN- γ sehr stabil ausgereift waren und dabei funktionell nicht beeinträchtigt waren.

Vor einigen Jahren zeigten Gauzzi et al., dass nur unreife im Gegensatz zu aktivierten DCs in der Lage sind, auf exogenes Typ-I-IFN (α und β) zu reagieren. Schon wenige Stunden nach Aktivierung mit Lipopolysaccharid, ein potenter bakterieller Stimulus,

kam es zu einer verminderten Expression der beiden Untereinheiten des Typ-I-IFN-Rezeptors [Gauzzi, 2002]. Eine kurz nach dem Eintritt eines Krankheitserregers stattfindende Typ-I-IFN Produktion könnte somit, zusammen mit anderen proinflammatorischen Zytokinen, eine Ausreifung der noch unreifen DCs im Gewebe bewirken, welche dann die Fähigkeit erlangen, in Lymphknoten zu wandern, um dort T-Zellen zu aktivieren [Banchereau, 2000; McColl, 2002; Randolph, 2001; Sallusto und Lanzavecchia, 2000]. Erst dort findet durch die Interaktion mit T-Helferzellen eine terminale Differenzierung und IL-12 Produktion statt.

4.2.2.4. Induktion von T-Gedächtniszellen durch IFN- α -*FastDCs*

Um die durch IFN- α -*FastDCs* induzierte Immunantwort genauer zu analysieren, wurden verschiedene ELISPOT-Tests durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass IFN- α -*FastDCs* vor allem in autologen pan-T-Zellen eine vermehrte IFN- γ Produktion als Antwort auf das Antigen Tetanustoxoid induzierten, wohingegen sie das *priming* ungeprägter T-Zellen nicht verbesserten. Dieser Befund spricht dafür, dass IFN- α -*FastDCs* wahrscheinlich selektiv die Proliferation von CD4⁺CD45RO⁺ T-Zellen, also T-Gedächtniszellen, fördern können und nicht das Wachstum von ungeprägten CD4⁺CD45RO⁻ T-Helferzellen. Dies passt zu den Ergebnissen von Carbonneil et al., die nur eine schwache Proliferation ungeprägter CD4⁺CD45RO⁻ T-Helferzellen beobachten konnten, wenn die DCs zuvor mit Typ-I-IFN behandelt worden waren [Carbonneil, 2004]. Kürzlich wurde von unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass IFN- α das *priming* von CD8⁺ CTLs durch *FastDCs* nicht beeinflusst und *FastDCs* Antigen-spezifische CTLs induzieren können und gezielt auf Chemokine wie den CCR-7-Liganden 6CKine migrieren können [Dauer, 2006]. Unklar ist aber noch, ob IFN- α -*FastDCs* eventuell auf CD8⁺ Gedächtnis-CTLs wirken. Aus Versuchen mit plasmazytoiden DCs ist allerdings schon bekannt, dass Typ-I-Interferone selektiv eine Immunantwort von CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen bewirken und damit Zytotoxizität induzieren können [Rothenfusser, 2004].

4.2.2.5. Auswirkung von IFN- α auf die Zytokinproduktion der *FastDCs*

IL-12 ist ein wichtiges Zytokin, welches von reifen DCs gebildet wird und eine „Schlüsselrolle“ bei der Aktivierung des angeborenen und erworbenen Immunsystems ein-

nimmt [Trinchieri, 1998]. Das biologisch wirksame IL-12(p70) ist ein Heterodimer, das sich aus den beiden Untereinheiten p35 und p40 zusammensetzt [Gately, 1998]. Es wird von DCs während der Interaktion mit T_H-Zellen über den Kontakt mit CD40/CD40-L produziert [Cella, 1996; Kalinski, 2001; Snijders, 1998] und verschiebt die ausgelöste Immunantwort in Richtung T_H1-Typ [Heufler, 1996; Macatonia, 1995]. In den vorgelegten Untersuchungen wurde beobachtet, dass IFN- α -*FastDCs* im Gegensatz zu normalen *FastDCs* nur noch verschwindend geringe Mengen an gesamtem IL-12, bestehend aus der p40 und p70 Untereinheit, und an biologisch aktivem IL12(p70) produzieren, auch nach Aktivierung mit starken IL-12-Induktoren wie CD40-L und IFN- γ . Diese Befunde stimmen mit anderen Untersuchungen überein, in denen wiederholt beschrieben wurde, dass IFN- α die IL-12 Produktion in DCs vermindert [Dauer, 2003b; Della Bella, 2004; McRae, 1998]. Die insgesamt niedrige Produktion von IL-12 ist möglicherweise auch auf das von uns zur Aktivierung der DCs verwendete PGE₂ zurückzuführen, da dieses die IL-12 Produktion von DCs vermindern kann [Kalinski, 2001; Mailliard, 2004; Xu, 2003]. PGE₂ wurde trotzdem zur DC-Aktivierung verwendet, vor allem um ein bestmögliches Reifen und Überleben zu erreichen [Jonuleit, 1997; Vassiliou, 2004]. Außerdem entsprach die DC-Generierung so auch dem üblichen „Standard“ [Schuler, 2003] und war mit der *wash-out* Kultur von Feuerstein et al. vergleichbar [Feuerstein, 2000]. Trotz mangelnder IL-12 Produktion waren IFN- α -*FastDCs* aber genauso wie *FastDCs* in der Lage, naive T-Helferzellen und Antigen-spezifische CTLs zu *primen* [Dauer, 2006], so dass man dafür einen unbekanntem, IL-12(p70)-unabhängigen Mechanismus vermuten kann.

Weshalb IFN- α -*FastDCs* vorzugsweise T-Gedächtniszellen aktivierten, ist noch unbekannt. Möglicherweise spielt dabei die vermehrte Bildung von IL-23 nach Kontakt mit Typ-I-IFN in den DCs eine Rolle [Nagai, 2003; van Seventer, 2002]. IL-23 ist ein Zytokin aus der IL-12 Familie, das sich aus einer p19 und p40 Untereinheit zusammensetzt und vorzugsweise auf T-Gedächtniszellen wirkt [Lankford und Frucht, 2003]. Schnurr et al. konnten in dem Zusammenhang nachweisen, dass PGE₂ nicht nur die Produktion von IL-12 vermindert, welches vorzugsweise auf naive T-Zellen wirkt, sondern auch die Bildung von IL-23 induzieren kann [Schnurr, 2005]. Es war jedoch in unseren Versuchen nicht möglich, eine vermehrte IL-23 oder IL-18 Expression in den IFN- α -*FastDCs* nachzuweisen. IL-18 ist ein Zytokin, welches mit IL-12 gemeinsam eine T_H1-Immunantwort induzieren kann [Nakanishi, 2001] und nach dem Kontakt mit Typ-I-IFN von DCs vermehrt gebildet wird [Nagai, 2003].

4.3. Klinische Relevanz der Ergebnisse

Seit Veröffentlichung der ersten klinischen Studie zur zellulären Immuntherapie mit dendritischen Zellen 1996 [Hsu, 1996] wurde daran gearbeitet, diese Therapieform zu verbessern. Obwohl in zahlreichen unterschiedlichen experimentellen Ansätzen und Tiermodellen gezeigt wurde, dass die DC-Vakzinierung eine viel versprechende Behandlungsmöglichkeit für Tumorpatienten darstellt, muss die Immuntherapie weiter standardisiert und optimiert werden, um sie bei Patienten mit geringer Tumorlast einsetzen zu können [Cerundolo, 2004; Figdor, 2004]. Bisher hatten die DC-Generierungs-Protokolle die Nachteile, dass sie sehr zeitaufwendig und durch die große Menge benötigter rekombinanter Zytokine auch sehr teuer waren. Zusätzlich mussten für eine effektive Ausbeute sehr viele Vorläuferzellen aus dem Blut isoliert werden. Diese Nachteile haben möglicherweise mit dazu beigetragen, dass bisher größere klinische Studien ausstehen. Zum ersten Mal konnte hier gezeigt werden, dass *FastDCs* genauso gut wie Standard-moDCs eine Tumor-spezifische CTL-Antwort induzieren können. Es können durch Verwendung des *FastDC*-Protokolls nicht nur Tumorantigen-beladene DCs innerhalb kürzerer Zeit und somit kostengünstiger generiert, sondern auch mehr Zellen mit größerer Reinheit gewonnen werden. Die größere Ausbeute ermöglicht eine geringere Ausgangsmenge Blut und eignet sich deshalb möglicherweise für Tumorpatienten, die oft neben einer Vielzahl von Begleiterkrankungen auch eine Anämie aufweisen.

Des Weiteren wurden durch die Identifizierung von Zytokinen, welche die Differenzierung und Aktivierung von DCs verbessern, nicht nur wichtige Erkenntnisse zur Physiologie der aus Monozyten abgeleiteten *FastDCs* gewonnen, sondern auch zur Weiterentwicklung und Optimierung der DC-Vakzinierung für die klinische Anwendung. So konnte nachgewiesen werden, dass phänotypische Reife reversibel ist und nur durch unterschiedliche Aktivierungssignale optimales Überleben und Ausreifung erreicht wird. Durch Zugabe von IFN- α wurde die terminale Differenzierung eingeleitet und selektiv die Kapazität für die Stimulation einer T_H1-Gedächtniszellen Immunantwort begünstigt. Dadurch, dass man aus denselben Vorläuferzellen innerhalb kurzer Zeit durch verschiedene Stimuli potente DCs mit unterschiedlichen immunregulatorischen Fähigkeiten generieren kann, sind möglicherweise spezifische Adaptationen der DC-Vakzinierung je nach gewünschtem Effekt möglich, wie beispielsweise vermehrtes Ansprechen der T-Gedächtniszellen mit so genannten „*Prime-boost-Strategies*“ [Ramshaw und Ramsay, 2000; Woodland, 2004].

5. Zusammenfassung

Dendritische Zellen erkennen in den Körper eingedrungene Pathogene und regen naive T-Zellen zur Proliferation und Differenzierung in Effektorzellen an. Seit einigen Jahren gibt es Ansätze, dendritische Zellen zur Therapie maligner Tumore zu verwenden. Ziel ist es, eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort auszulösen, wozu autologe dendritische Zellen von Patienten *in vitro* mit Tumorantigenen beladen, ausgereift und dem Patienten reinjiziert werden. Reife dendritische Zellen können *in vitro* innerhalb von sechs bis neun Tagen aus Monozyten (moDCs) generiert werden. Von unserer Arbeitsgruppe wurde ein nur zwei Tage dauerndes Kurzzeit-Protokoll entwickelt (*FastDCs*). Mit den vorgelegten Untersuchungen sollte geklärt werden,

1. ob sich *FastDCs* von moDCs unterscheiden hinsichtlich Ausbeute, Reinheit, Zytokinproduktion und der Kapazität, eine zytotoxische T-Zell-Antwort zu induzieren, und
2. ob die Reifung und Stabilität von *FastDCs* durch Zugabe von Interferon- α (IFN- α) und T-Zell-abgeleiteten Stimuli zur Kultur verbessert werden kann.

Zur Generierung von dendritischen Zellen wurden Monozyten aus dem frischen Blut gesunder Spender isoliert und kultiviert. Für moDCs betrug die Differenzierungsphase fünf Tage und die Aktivierungsphase zwei Tage, für *FastDCs* die Differenzierung 24 Stunden und die Aktivierung 24 Stunden. Die dendritischen Zellen wurden mit Antigenen beladen und die Induktion Antigen-spezifischer T-Zellen quantifiziert. *FastDCs* und moDCs wiesen das für ausgereifte dendritische Zellen typische Muster an Oberflächenmolekülen auf. Gegenüber moDCs zeigten *FastDCs* jedoch eine höhere Ausbeute, größere Reinheit und gesteigerte Bildung von immunregulatorischen Zytokinen, die eine T_H1 -gewichtete Immunreaktion bewirken. Die Induktion Tumorantigen-spezifischer, zytotoxischer T-Zellen durch *FastDCs* und moDCs unterschied sich nicht. Durch *FastDCs* induzierte Tumorantigen-spezifische T-Zellen zeigten jedoch eine höhere lytische Aktivität als durch moDCs induzierte T-Zellen. Die Zugabe von IFN- α zum Kulturmedium der *FastDCs* (IFN- α -*FastDCs*) erbrachte gegenüber dem „normalen“ *FastDC*-Protokoll eine größere Fraktion phänotypisch reifer DCs über einen Beobachtungszeitraum von fünf Tagen bei Kultur ohne Zytokine oder Wachstumsfaktoren. Dieses Ergebnis konnte noch weiter verbessert werden durch Zugabe T-Zell-abgeleiteter Stimuli. Die Expression der mRNAs für immunregulatorische Zytokine war in *FastDCs*

und IFN- α -*FastDCs* vergleichbar. Weder die Proliferation allogener T-Zellen noch das *priming* autologer naiver T-Zellen wurde durch die erweiterten *FastDC*-Protokolle beeinflusst. Antigen-beladene IFN- α -*FastDCs* induzierten jedoch mehr IFN- γ bildende autologe T-Zellen als „normale“ *FastDCs*.

Das hier untersuchte verkürzte *FastDC*-Protokoll erhöht die Ausbeute und Reinheit der aus Monozyten generierten dendritischen Zellen gegenüber dem üblicherweise verwendeten moDC-Protokoll. Dadurch werden Zeit und Kosten eingespart und die Gefahr einer Verunreinigung der Kultur vermindert. *FastDCs* induzierten darüber hinaus T-Zellen mit vermehrter lytischer Aktivität. Sie verfügen somit grundsätzlich über die nötige Eigenschaft für den Einsatz von dendritischen Zellen in klinischen Studien. Die Erweiterung des *FastDC*-Protokolls mit IFN- α steigerte den Anteil stabil ausgereifter dendritischer Zellen über einen längeren Zeitraum ohne Funktionseinschränkung. Die Verwendung von IFN- α -*FastDCs* könnte somit den therapeutischen Effekt einer auf dendritischen Zellen basierenden Tumorummuntherapie verbessern.

6. Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K., K. M. Murphy and A. Sher (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383(6603): 787-793.
- Altman, J. D., P. A. Moss, P. J. Goulder, D. H. Barouch, M. G. McHeyzer-Williams, J. I. Bell, A. J. McMichael and M. M. Davis (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274(5284): 94-96.
- Asai, T., W. J. Storkus and T. L. Whiteside (2000). Evaluation of the modified ELISPOT assay for gamma interferon production in cancer patients receiving antitumor vaccines. *Clin Diagn Lab Immunol* 7(2): 145-154.
- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, J. Liu Y.-, B. Pulendran and K. Palucka (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18: 767-811.
- Banchereau, J., A. K. Palucka, M. Dhodapkar, S. Burkeholder, N. Taquet, A. Rolland, S. Taquet, S. Coquery, K. M. Wittkowski, N. Bhardwaj, L. Pineiro, R. Steinman and J. Fay (2001). Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34 progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res* 61(17): 6451-6458.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392(6673): 245-252.
- Bender, A., M. Sapp, G. Schuler, R. M. Steinman and N. Bhardwaj (1996). Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J Immunol Methods* 196(2): 121-135.
- Berger, T. G., B. Feuerstein, E. Strasser, U. Hirsch, D. Schreiner, G. Schuler and B. Schuler-Thurner (2002). Large-scale generation of mature monocyte-derived dendritic cells for clinical application in cell factories(TM). *J Immunol Methods* 268(2): 131-140.
- Bhardwaj, N. (2003). The modulation of immunity by dendritic cells. *Clin Appl Immunol Rev* 3(4-5): 173-182.
- Carbonneil, C., H. Saidi, V. Donkova-Petrini and L. Weiss (2004). Dendritic cells generated in the presence of interferon-alpha stimulate allogeneic CD4+ T-cell proliferation: modulation by autocrine IL-10, enhanced T-cell apoptosis and T regulatory type 1 cells. *Int Immunol* 16(7): 1037-1052.

- Caux, C., C. Dezutter-Dambuyant, D. Schmitt and J. Banchereau (1992). GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360(6401): 258-261.
- Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, C. Van Kooten, I. Durand and J. Banchereau (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 180(4): 1263-1272.
- Cella, M., A. Engering, V. Pinet, J. Pieters and A. Lanzavecchia (1997a). Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388(6644): 782-787.
- Cella, M., F. Sallusto and A. Lanzavecchia (1997b). Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 9(1): 10-6.
- Cella, M., D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia and G. Alber (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 184(2): 747-752.
- Cerundolo, V., I. F. Hermans and M. Salio (2004). Dendritic cells: A journey from laboratory to clinic. *Nature Immunol* 5(1): 7-10.
- Clay, T. M., A. C. Hobeika, P. J. Mosca, H. K. Lyerly and M. A. Morse (2001). Assays for monitoring cellular immune responses to active immunotherapy of cancer. *Clin Cancer Res* 7(5): 1127-1135.
- Czerniecki, B. J., C. Carter, L. Rivoltini, G. K. Koski, H. I. Kim, D. E. Weng, J. G. Roros, Y. M. Hijazi, S. Xu and a. Rosenberg et (1997). Calcium ionophore-treated peripheral blood monocytes and dendritic cells rapidly display characteristics of activated dendritic cells. *J Immunol* 159(8): 3823-3837.
- Dauer, M., B. Obermaier, J. Hertel, C. Haerle, K. Pohl, S. Rothenfusser, M. Schnurr, S. Endres and A. Eigler (2003a). Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: A novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *J Immunol* 170(8): 4069-4076.
- Dauer, M., K. Pohl, B. Obermaier, T. Meskendahl, J. Robe, M. Schnurr, S. Endres and A. Eigler (2003b). Interferon- γ disables dendritic cell precursors: Dendritic cells derived from interferon- γ -treated monocytes are defective in maturation and T-cell stimulation. *Immunology* 110(1): 38-47.
- Dauer, M., K. Schad, J. Junkmann, C. Bauer, J. Hertel, R. Kiehl, M. Schnurr, S. Endres and A. Eigler (2006). IFN- α promotes definitive maturation of dendritic cells

- generated by short-term culture of monocytes with GM-CSF and IL-4. *J Leukoc Biol* 80(2): 278-286.
- De Maeyer, E. and J. De Maeyer-Guignard (1998). Type I interferons. *Int Rev Immunol* 17(1-4): 53-73.
- Della Bella, S., S. Nicola, A. Riva, M. Biasin, M. Clerici and M. L. Villa (2004). Functional repertoire of dendritic cells generated in granulocyte macrophage-colony stimulating factor and interferon-. *J Leukoc Biol* 75(1): 106-116.
- Dhodapkar, M. V., R. M. Steinman, J. Krasovsky, C. Munz and N. Bhardwaj (2001). Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 193(2): 233-238.
- Dieu, M. C., B. Vanbervliet, A. Vicari, J. M. Bridon, E. Oldham, S. Ait-Yahia, F. Briere, A. Zlotnik, S. Lebecque and C. Caux (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 188(2): 373-386.
- Faries, M. B., I. Bedrosian, S. Xu, G. Koski, J. G. Roros, M. A. Moise, H. Q. Nguyen, F. H. C. Engels, P. A. Cohen and B. J. Czerniecki (2001). Calcium signaling inhibits interleukin-12 production and activates CD83 dendritic cells that induce Th2 cell development. *Blood* 98(8): 2489-2497.
- Feuerstein, B., T. G. Berger, C. Maczek, C. Roder, D. Schreiner, U. Hirsch, I. Haendle, W. Leisgang, A. Glaser, O. Kuss, T. L. Diepgen, G. Schuler and B. Schuler-Thurner (2000). A method for the production of cryopreserved aliquots of antigen-preloaded, mature dendritic cells ready for clinical use. *J Immunol Methods* (1-2): 15-29.
- Figdor, C. G., I. J. M. De Vries, W. J. Lesterhuis and C. J. M. Melief (2004). Dendritic cell immunotherapy: Mapping the way. *Nature Med* 10(5): 475-480.
- Fong, L. and E. G. Engleman (2000). Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 18:245-18273.
- Fong, L., Y. Hou, A. Rivas, C. Benike, A. Yuen, G. A. Fisher, M. M. Davis and E. G. Engleman (2001). Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. *PNAS* 98(15): 8809-8814.
- Gabriele, L., P. Borghi, C. Rozera, P. Sestili, M. Andreotti, A. Guarini, E. Montefusco, R. Foa and F. Belardelli (2004). IFN-alpha promotes the rapid differentiation of monocytes from patients with chronic myeloid leukemia into activated dendritic cells tuned to undergo full maturation after LPS treatment. *Blood* 103(3): 980-987.

-
- Gately, M. K., L. M. Renzetti, J. Magram, A. S. Stern, L. Adorini, U. Gubler and D. H. Presky (1998). The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol* 16: 495-521.
- Gauzzi, M. C., I. Canini, P. Eid, F. Belardelli and S. Gessani (2002). Loss of type I IFN receptors and impaired IFN responsiveness during terminal maturation of monocyte-derived human dendritic cells. *J Immunol* 169(6): 3038-3045.
- Gilboa, E. (1999). How tumors escape immune destruction and what we can do about it. *Cancer Immunol Immunother* 48(7): 382-385.
- Guermonprez, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Thery and S. Amigorena (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20: 621-667.
- Heiser, A., D. Coleman, J. Dannull, D. Yancey, M. A. Maurice, C. D. Lallas, P. Dahm, D. Niedzwiecki, E. Gilboa and J. Vieweg (2002). Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J Clin Invest* 109(3): 409-417.
- Herberman, R. B. (1997). Effect of alpha-interferons on immune function. *Semin Oncol* 24(3 Suppl 9): S9-78-S9-80.
- Heufler, C., F. Koch, U. Stanzl, G. Topar, M. Wysocka, G. Trinchieri, A. Enk, R. M. Steinman, N. Romani and G. Schuler (1996). Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol* 26(3): 659-668.
- Hsu, F. J., C. Benike, F. Fagnoni, T. M. Liles, D. Czerwinski, B. Taidi, E. G. Engleman and R. Levy (1996). Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nature Med* 2(1): 52-58.
- Jonuleit, H., A. Giesecke-Tuettenberg, T. Tuting, B. Thurner-Schuler, T. B. Stuge, L. Paragnik, A. Kandemir, P. P. Lee, G. Schuler and a. Knop et (2001). A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. *Int J Cancer* 93(2): 243-251.
- Jonuleit, H., U. Kuhn, G. Muller, K. Steinbrink, L. Paragnik, E. Schmitt, J. Knop and A. H. Enk (1997). Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* 27(12): 3135-3142.
- Kalinski, P., J. H. Schuitemaker, C. M. Hilkens, E. A. Wierenga and M. L. Kapsenberg (1999). Final maturation of dendritic cells is associated with impaired respon-

- siveness to IFN-gamma and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. *J Immunol* 162(6): 3231-3236.
- Kalinski, P., P. L. Vieira, J. H. Schuitemaker, E. C. de Jong and M. L. Kapsenberg (2001). Prostaglandin E(2) is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer. *Blood* 97(11): 3466-3469.
- Kalyuzhny, A. and S. Stark (2001). A simple method to reduce the background and improve well-to-well reproducibility of staining in ELISPOT assays. *J Immunol Methods* 7(1-2): 93-97.
- Kaminski, W. E., E. Jendraschak, K. Baumann, R. Kiefl, S. Fischer, A. J. Marcus, M. J. Broekman and C. von Schacky (1996). Human mononuclear cells express 12-LX: coordinated mRNA regulation with 5-LX and FLAP genes. *Blood* 87(1): 331-340.
- Kuzushima, K., Y. Hoshino, K. Fujii, N. Yokoyama, M. Fujita, T. Kiyono, H. Kimura, T. Morishima, Y. Morishima and a. Tsurumi et (1999). Rapid determination of Epstein-Barr virus-specific CD8(+) T-cell frequencies by flow cytometry. *Blood* 94(9): 3094-3100.
- Langenkamp, A., M. Messi, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2000). Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nature Immunol* 1(4): 311-316.
- Lankford, C. S. and D. M. Frucht (2003). A unique role for IL-23 in promoting cellular immunity. *J Leukoc Biol* 73(1): 49-56.
- Lapointe, R., J. F. Toso, C. Butts, H. A. Young and P. Hwu (2000). Human dendritic cells require multiple activation signals for the efficient generation of tumor antigen-specific T lymphocytes. *Eur J Immunol* 30(11): 3291-3298.
- Luft, T., M. Jefford, P. Luetjens, T. Toy, H. Hochrein, K. A. Masterman, C. Maliszewski, K. Shortman, J. Cebon and E. Maraskovsky (2002). Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E(2) regulates the migratory capacity of specific DC subsets. *Blood* 100(4): 1362-1372.
- Lyerly, H. K. (2003). Quantitating cellular immune responses to cancer vaccines. *Semin Oncol* 30(3, Suppl 8): 9-16.
- Macatonia, S. E., N. A. Hosken, M. Litton, P. Vieira, C. S. Hsieh, J. A. Culpepper, M. Wysocka, G. Trinchieri, K. M. Murphy and A. O'Garra (1995). Dendritic cells

- produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 154(10): 5071-5079.
- Mailliard, R. B., A. Wankowicz-Kalinska, Q. Cai, A. Wesa, C. M. Hilkens, M. L. Kapsenberg, J. M. Kirkwood, W. J. Storkus and P. Kalinski (2004). alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. *Cancer Res* 64(17): 5934-5937.
- McColl, S. R. (2002). Chemokines and dendritic cells: a crucial alliance. *Immunol Cell Biol* 80(5): 489-496.
- McRae, B. L., R. T. Semnani, M. P. Hayes and G. A. van Seventer (1998). Type I IFNs inhibit human dendritic cell IL-12 production and Th1 cell development. *J Immunol* 160(9): 4298-4304.
- Mehta-Damani, A., S. Markowicz and E. G. Engleman (1994). Generation of antigen-specific CD8+ CTLs from naive precursors. *J Immunol* 153(3): 996-1003.
- Mosca, P. J., A. C. Hobeika, T. M. Clay, S. K. Nair, E. K. Thomas, M. A. Morse and H. K. Lyerly (2000). A subset of human monocyte-derived dendritic cells expresses high levels of interleukin-12 in response to combined CD40 ligand and interferon-gamma treatment. *Blood* 96(10): 3499-3504.
- Murphy, K. M. and S. L. Reiner (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nature Rev Immunol* 2(12): 933-944.
- Nagai, T., O. Devergne, T. F. Mueller, D. L. Perkins, J. M. van Seventer and G. A. van Seventer (2003). Timing of IFN-beta exposure during human dendritic cell maturation and naive Th cell stimulation has contrasting effects on Th1 subset generation: a role for IFN-beta-mediated regulation of IL-12 family cytokines and IL-18 in naive Th cell differentiation. *J Immunol* 171(10): 5233-5243.
- Nakanishi, K., T. Yoshimoto, H. Tsutsui and H. Okamura (2001). Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol* 19: 423-474.
- Nestle, F. O., S. Aljagic, M. Gilliet, Y. Sun, S. Grabbe, R. Dummer, G. Burg and D. Schadendorf (1998). Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nature Med* 4(3): 328-332.
- Obermaier, B., M. Dauer, J. Herten, K. Schad, S. Endres and A. Eigler (2003). Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes. *Biol Proced Online* 5: 197-203.
- Ogg, G. S., X. Jin, S. Bonhoeffer, P. R. Dunbar, M. A. Nowak, S. Monard, J. P. Segal, Y. Cao, S. L. Rowland-Jones, V. Cerundolo, A. Hurley, M. Markowitz, D. D. Ho,

- D. F. Nixon and A. J. McMichael (1998). Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* 279(5359): 2103-2106.
- Padovan, E., G. C. Spagnoli, M. Ferrantini and M. Heberer (2002). IFN-alpha2a induces IP-10/CXCL10 and MIG/CXCL9 production in monocyte-derived dendritic cells and enhances their capacity to attract and stimulate CD8+ effector T cells. *J Leukoc Biol* 71(4): 669-676.
- Palucka, K. and J. Banchereau (1999). Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity. *J Clin Immunol* 19(1): 12-25.
- Palucka, K. A., N. Taquet, F. Sanchez-Chapuis and J. C. Gluckman (1998). Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J Immunol* 160(9): 4587-4595.
- Paquette, R. L., N. C. Hsu, S. M. Kiertscher, A. N. Park, L. Tran, M. D. Roth and J. A. Glaspy (1998). Interferon-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol* 64(3): 358-367.
- Parlato, S., S. M. Santini, C. Lapenta, T. Di Pucchio, M. Logozzi, M. Spada, A. M. Giammarioli, W. Malorni, S. Fais and F. Belardelli (2001). Expression of CCR-7, MIP-3beta, and Th-1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells: importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities. *Blood* 98(10): 3022-3029.
- Ramshaw, I. A. and A. J. Ramsay (2000). The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunol Today* 21(4): 163-165.
- Randolph, G. J. (2001). Dendritic cell migration to lymph nodes: Cytokines, chemokines, and lipid mediators. *Semin Immunol* 13(5): 267-274.
- Randolph, G. J., S. Beaulieu, S. Lebecque, R. M. Steinman and W. A. Muller (1998). Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 282(5388): 480-483.
- Reddy, A., M. Sapp, M. Feldman, M. Subklewe and N. Bhardwaj (1997). A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells. *Blood* 90(9): 3640-3646.
- Reichardt, V. L., P. Brossart and L. Kanz (2004). Dendritic cells in vaccination therapies of human malignant disease. *Blood Rev* 18(4): 235-43.
- Romani, N., S. Gruner, D. Brang, E. Kampgen, A. Lenz, B. Trockenbacher, G. Konwalinka, P. O. Fritsch, R. M. Steinman and a. Schuler et (1994). Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 180(1): 83-93.

- Romani, N., D. Reider, M. Heuer, S. Ebner, E. Kampgen, B. Eibl, D. Niederwieser and G. Schuler (1996). Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* (2): 137-151.
- Rothenfusser, S., V. Hornung, M. Ayyoub, S. Britsch, A. Towarowski, A. Krug, A. Sarris, N. Lubenow, D. Speiser, S. Endres and G. Hartmann (2004). CpG-A and CpG-B oligonucleotides differentially enhance human peptide-specific primary and memory CD8⁺ T-cell responses in vitro. *Blood* 103(6): 2162-2169.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179(4): 1109-1118.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (2000). Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev* 177: 134-140.
- Salter, R. D., D. N. Howell and P. Cresswell (1985). Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics* 21(3): 235-246.
- Santana, M. A. and Y. Rosenstein (2003). What it takes to become an effector T cell: the process, the cells involved, and the mechanisms. *J Cell Physiol* 195(3): 392-401.
- Santini, S. M., C. Lapenta, M. Logozzi, S. Parlato, M. Spada, T. Di Pucchio and F. Belardelli (2000). Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *J Exp Med* 191(10): 1777-1788.
- Santodonato, L., G. D'Agostino, R. Nisini, S. Mariotti, D. M. Monque, M. Spada, L. Lattanzi, M. P. Perrone, M. Andreotti, F. Belardelli and M. Ferrantini (2003). Monocyte-derived dendritic cells generated after a short-term culture with IFN-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulate a potent Epstein-Barr virus-specific CD8⁺ T cell response. *J Immunol* 170(10): 5195-5202.
- Schnurr, M., T. Toy, A. Shin, M. Wagner, J. Cebon and E. Maraskovsky (2005). Extracellular nucleotide signaling by P2 receptors inhibits IL-12 and enhances IL-23 expression in human dendritic cells: a novel role for the cAMP pathway. *Blood* 105(4): 1582-1589.
- Schuler, G., B. Schuler-Thurner and R. M. Steinman (2003). The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 15(2): 138-147.

- Schuler-Thurner, B., D. Dieckmann, P. Keikavoussi, A. Bender, C. Maczek, H. Jonuleit, C. Roder, I. Haendle, W. Leisgang, R. Dunbar, V. Cerundolo, P. Von den Driesch, J. Knop, E. B. Brocker, A. Enk, E. Kampgen and G. Schuler (2000). Mage-3 and influenza-matrix peptide-specific cytotoxic T cells are inducible in terminal stage HLA-A2.1 Melanoma patients by mature monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 165(6): 3492-3496.
- Shortman, K. and W. R. Heath (2001). Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells. *Nature Immunol* 2(11): 988-989.
- Snijders, A., P. Kalinski, C. M. Hilkens and M. L. Kapsenberg (1998). High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *Int Immunol* 10(11): 1593-1598.
- Song, C. H., H. J. Kim, J. K. Park, J. H. Lim, U. O. Kim, J. S. Kim, T. H. Paik, K. J. Kim, J. W. Suhr and E. K. Jo (2000). Depressed interleukin-12 (IL-12), but not IL-18, production in response to a 30- or 32-kilodalton mycobacterial antigen in patients with active pulmonary tuberculosis. *Infect Immun* 68(8): 4477-4484.
- Sozzani, S., P. Allavena, G. D'Amico, W. Luini, G. Bianchi, M. Kataura, T. Imai, O. Yoshie, R. Bonecchi and A. Mantovani (1998). Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* 161(3): 1083-1086.
- Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137(5): 1142-1162.
- Steinman, R. M., S. Turley, I. Mellman and K. Inaba (2000). The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 191(3): 411-416.
- Stoll, S., H. Jonuleit, E. Schmitt, G. Muller, H. Yamauchi, M. Kurimoto, J. Knop and A. H. Enk (1998). Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development. *Eur J Immunol* 28(10): 3231-3239.
- Sun, Y., E. Iglesias, A. Samri, G. Kamkamidze, T. Decoville, G. Carcelain and B. Autran (2003). A systematic comparison of methods to measure HIV-1 specific CD8 T cells. *J Immunol Methods* 272(1-2): 23-34.
- Takahata, Y., H. Takada, A. Nomura, K. Ohshima, H. Nakayama, T. Tsuda, H. Nakano and T. Hara (2001). Interleukin-18 in human milk. *Pediatr Res* 50(2): 268-272.

- Tan, L. C., N. Gudgeon, N. E. Annels, P. Hansasuta, C. A. O'Callaghan, S. Rowland-Jones, A. J. McMichael, A. B. Rickinson and M. F. Callan (1999). A re-evaluation of the frequency of CD8+ T cells specific for EBV in healthy virus carriers. *J Immunol* 162(3): 1827-1835.
- Thurner, B., C. Roder, D. Dieckmann, M. Heuer, M. Kruse, A. Glaser, P. Keikavoussi, E. Kampgen, A. Bender and G. Schuler (1999). Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J Immunol Methods* 223(1): 1-15.
- Trinchieri, G. (1998). Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv Immunol* 70:83-7243.
- Tuyaerts, S., S. M. Noppe, J. Corthals, K. Breckpot, C. Heirman, C. De Greef, I. Van Riet and K. Thielemans (2002). Generation of large numbers of dendritic cells in a closed system using Cell Factories(TM). *J Immunol Methods* 264(1-2): 135-151.
- Valmori, D., J. F. Fonteneau, C. M. Lizana, N. Gervois, D. Lienard, D. Rimoldi, V. Jongeneel, F. Jotereau, J. C. Cerottini and a. Romero et (1998). Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues. *J Immunol* 160(4): 1750-1758.
- van Seventer, J. M., T. Nagai and G. A. van Seventer (2002). Interferon-beta differentially regulates expression of the IL-12 family members p35, p40, p19 and EB13 in activated human dendritic cells. *J Neuroimmunol* 133(1-2): 60-71.
- Vassiliou, E., V. Sharma, H. Jing, F. Sheibanie and D. Ganea (2004). Prostaglandin E2 promotes the survival of bone marrow-derived dendritic cells. *J Immunol* 173(11): 6955-6964.
- Vieira, P. L., E. C. de Jong, E. A. Wierenga, M. L. Kapsenberg and P. Kalinski (2000). Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *J Immunol* 164(9): 4507-4512.
- Wesa, A. and A. Galy (2002). Increased production of pro-inflammatory cytokines and enhanced T cell responses after activation of human dendritic cells with IL-1 and CD40 ligand. *BMC Immunol* 3(1): 14.
- Woodland, D. L. (2004). Jump-starting the immune system: prime-boosting comes of age. *Trends Immunol* 25(2): 98-104.
- Xu, S., G. K. Koski, M. Faries, I. Bedrosian, R. Mick, M. Maeurer, M. A. Cheever, P. A. Cohen and B. J. Czerniecki (2003). Rapid high efficiency sensitization of CD8 T cells to tumor antigens by dendritic cells leads to enhanced functional avidity

and direct tumor recognition through an IL-12-dependent mechanism. *J Immunol* 171(5): 2251-2261.

7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

APC	Antigen-präsentierende Zelle
apc	Allophycocyanin
BSA	Bovines Serum Albumin
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
CCR	Chemokinrezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD40-L	CD40-Ligand
cDNA	<i>copy-Desoxyribonukleinsäure</i>
cpm	<i>Counts per minute</i>
CTL	Zytotoxische T-Zelle
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Effektorzelle
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELISPOT	<i>Enzyme-linked immunospot assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isocyanat
FSC	<i>Forward scatter</i>
g	Erdbeschleunigung
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HSA	Humanes Serum Albumin
IFN	Interferon
IFN- α -FastDCs	Monozyten-abgeleitete dendritische Zelle (48 Stunden) plus Interferon- α .
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
FastDCs	Monozyten-abgeleitete dendritische Zelle (48 Stunden)
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>

Mel	Melan-A Peptid
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
min	Minute(n)
ml	Milliliter
<i>MLR</i>	<i>Mixed lymphocyte reaction</i>
moDC	Monozyten abgeleitete dendritische Zelle (7 Tage)
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NaCl	Natrium-Chlorid
NAZ	Nicht-adhärente Zelle(n)
PBMC	<i>Peripheral blood monocyte cells</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerithrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-A-Protein
PGE ₂	Prostaglandin E2
PHA	Phytohämagglutinin
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
Pol	HIV-Pol Antigen
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
S	Sekunde(n)
SEM	<i>Standard error of mean</i>
SSC	<i>Sideward scatter</i>
TAP	<i>Transporters associated with antigen processing</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- β	<i>Tumor growth factor</i>
T _H	T-Helferzelle
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TT	Tetanustoxoid
Z	Zielzelle

8. Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Professor Dr. med. Stefan Endres bedanken, dass mir die Bearbeitung dieses Themas im Rahmen der Förderung für Forschung und Lehre überlassen wurde und ich in seine hervorragende Arbeitsgruppe so freundlich aufgenommen wurde. Ganz besonderer Dank gilt auch der fortwährenden Unterstützung und der Möglichkeit zur Teilnahme an internationalen Kongressen.

Für die exzellente kontinuierliche Betreuung und die professionelle Anleitung für meine wissenschaftliche Tätigkeit möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Marc Dauer, meinem Betreuer, und Herrn PD Dr. med. Andreas Eigler, Leiter der Arbeitsgruppe Gastroenterologische Immuntherapie, ganz herzlich bedanken.

Desweiteren gilt mein Dank meinen Mitdoktoranden Jan Herten und Jana Junkmann für die nette Einarbeitung und Zusammenarbeit. Ebenso danke ich Rosemarie Kiefl für ihre tatkräftige Unterstützung bei jeder Tages- und Nachtzeit.

Bei meinen Eltern und meinem Freund Carsten Balfanz möchte ich mich ganz herzlich für ihre unermüdliche Geduld und Unterstützung bedanken.

9. Veröffentlichungen

Veröffentlichungen:

Obermaier B, Dauer M (contributed equally), Herten J, **Schad K**, Endres S, Eigler A.
Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes.

Biol Proced Online 2003, (5) 197-203. Epub 2003 Oct 24.

Dauer M, **Schad K**, Herten J, Endres S, Eigler A.

Dendritic Cell Differentiation (Letter response).

J Immunol 2004, (172) 3-4.

Dauer M, **Schad K**, Herten J, Junkmann J, Bauer C, Kiefl R, Endres S, Eigler A.

FastDC derived from human monocytes within 48 hours effectively prime tumor antigen-specific cytotoxic T cells.

J Immunol Methods 2005 Jul; 302 (1-2):145-55.

Dauer M, Herten J, Bauer C, Renner F, **Schad K**, Schnurr M, Endres S, Eigler A.

Chemosensitization of pancreatic carcinoma cells to enhance T cell-mediated cytotoxicity induced by tumor lysate-pulsed dendritic cells.

J Immunother 2005 Jul-Aug; 28 (4): 332-42.

Dauer M, **Schad K**, Junkmann J, Bauer C, Herten J, Kiefl R, Schnurr M, Endres S, Eigler A.

IFN- α promotes definitive maturation of dendritic cells generated by short-term culture of monocytes with GM-CSF and IL-4.

J Leukoc Biol 2006 Aug; 80: 278-286.

Publizierte Abstracts und Poster:

Dauer M, Herten J, Eigenbrod S, **Schad K**, Endres S, Eigler A.

Steigerung der durch dendritische Zellen induzierten zytotoxischen T-Zell-Antwort gegen Pankreaskarzinomzellen durch Vorbehandlung mit Gemcitabine und Cyclooxygenase-2-Inhibitoren.

58. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten 2003, Nürnberg.

Z Gastroenterol 2003 (41) 833.

Dauer M, Herten J, Eigenbrod S, **Schad K**, Endres S, Eigler A.

Vorbehandlung von Pankreaskarzinomzellen mit Chemotherapie und Cyclooxygenase-2-Inhibitoren steigert die Effektivität einer durch dendritische Zellen induzierten zytotoxischen T-Zell-Antwort.

31. Kongreß der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern 2003, Herzogenaurach.

Z Gastroenterol 2003 (41) 944.

Schad K, Dauer M, Herten J, Obermaier B, Kiefl R, Endres S, Eigler A.

Generation of monocyte-derived dendritic cells for tumor vaccination: optimal maturation requires IFN- α and CD40 ligand.

7th International Meeting Biotherapy of Cancer 2003, München, P12.

Herten J, Dauer M, Eigenbrod S, **Schad K**, Endres S, Eigler A.

Dendritic cell-induced CTL responses against pancreatic carcinoma cells can be enhanced by pretreatment with gemcitabine and cyclooxygenase-2-inhibitors.

7th International Meeting Biotherapy of Cancer 2003, München, P5.

Dauer M, Herten J, **Schad K**, Eigenbrod S, Endres S, Eigler A

Pretreatment with gemcitabine and cyclooxygenase-2-inhibitors sensitizes pancreatic carcinoma cells to cytotoxic T cell responses induced by tumor-lysate pulsed dendritic cells.

Digestive Disease Week 2004, New Orleans, USA

Gastroenterology 2004 (126) A1-815.

Schad K, Dauer M, Herten J, Kiefl R, Endres S, Eigler A.

FastDC derived from human monocytes within 48 hours effectively prime tumor antigen-specific cytotoxic T-cells.

8th International Symposium on Dendritic Cells 2004, Brügge, Belgien

P225, S124.

10. Lebenslauf

Katharina Schad, geboren am 22. Mai 1979 in München

als älteste Tochter von Erika Schad und Prof. Dr. med. Hubert Schad

Schulische Ausbildung:

1985-1990 Grundschule Gernlinden
 1990-1999 Gymnasium Olching mit Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife (Note: 2,0)

Freiwilliges soziales Jahr:

1999-2000 Abteilung für Hals-Nasen-Ohren Heilkunde
 Städtisches Krankenhaus München Schwabing

Studium:

April 2000 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der LMU-München
 Mai 2002 Ärztliche Vorprüfung (Note: 2,66)
 März 2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2,0)
 September 2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2,0)
 November 2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1,0)
 Abschluss des Studiums der Humanmedizin (Gesamtnote: 1,66) und Erlangung der ärztlichen Approbation

Praktisches Jahr (2005-2006):

1. Tertial: Abteilung für Allgemein und Gefäßchirurgie, Krankenhaus Dritter Orden, München
 2. Tertial: 6. Medizinische Abteilung, Schwerpunkt Nieren- und Hochdruckkrankungen und Rheumatologie, Klinikum Schwabing, München
 3. Tertial: Department of Anesthesiology, Mount Sinai School of Medicine, New York, USA
 Klinik für Anästhesiologie, Klinikum Innenstadt der LMU München

Promotion:

2003-2005 Dissertation bei Herrn Prof. Dr. med. S. Endres, Abteilung für Klinische Pharmakologie, Medizinische Klinik Innenstadt der LMU München

Stipendium:

2003-2004 Förderung für Forschung und Lehre, LMU München

Beruf:

Ab Januar 2007 Assistenzärztin in der Klinik für Anästhesiologie, Klinikum der LMU München