

Fas Ligand-exprimierende humane dendritische Zellen
zur Induktion von T-Zelltoleranz:
Phänotypische und funktionelle Charakterisierung

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der naturwissenschaftlichen Fakultät III
- Biologie und Vorklinische Medizin -
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Sabine Hoves
aus Wuppertal

Regensburg, 2003

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. C. Aslanidis und PD Dr. M. Fleck.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 10. Dezember 2003

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Februar 2004

Prüfungsausschuss

Vorsitzender: Prof. Dr. G. Hauska

1. Gutachter: Prof. Dr. C. Aslanidis

2. Gutachter: PD Dr. M. Fleck

3. Prüfer: Prof. Dr. A. Kurtz

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
I.1	Das Immunsystem	1
I.1.1	Toleranz	3
I.1.2	Autoimmunkrankheiten	4
I.2	Apoptose	5
I.3	Experimentelle Ansätze zur Induktion antigenspezifischer Toleranz	8
I.3.1	FasL-exprimierende Killer-APC	9
I.4	Zielsetzung der Arbeit	11
II	Material und Methoden	12
II.1	Zellbiologische Methoden	12
II.1.1	Grundlegende Techniken	12
II.1.1.1	Kultivierung von Zellen	12
II.1.1.2	Zentrifugation von Zellen	12
II.1.1.3	Ermittlung der Zellzahl durch Trypanblau-Ausschlussfärbung	12
II.1.1.4	Autologes Plasma	13
II.1.2	Zelllinien	13
II.1.2.1	Jurkat T-Zellen	13
II.1.2.2	HEK 293 Zellen	13
II.1.3	Primärzellen	14
II.1.3.1	Elutrierung zur Gewinnung von Monozyten und T-Lymphozyten	14
II.1.3.2	Generierung von DC aus Monozyten in vitro	15
II.1.3.2.1	Transduktion von DC mit adenoviralen Vektoren	15
II.1.3.3	T-Lymphozyten	16
II.1.3.3.1	Sortieren von T-Lymphozyten in CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellsubpopulationen mit dem MACS-System	16
II.1.3.4	Aktivierung von T-Lymphozyten	18
II.1.3.4.1	Polyklonale Aktivierung von T-Lymphozyten	18
II.1.3.4.2	Allogene Aktivierung von T-Lymphozyten	18
II.1.3.4.3	Kokulturen von DC und Jurkat T-Zellen oder T-Lymphozyten für durchflusszytometrische Analysen	19
II.1.4	FACS-Analysen zur Phänotypisierung von Monozyten, DC und T-Lymphozyten	20
II.1.5	Funktionelle Analysen	22
II.1.5.1	Nachweis von Apoptose durch Färbung mit Annexin V-FITC und Propidiumjodid	22
II.1.5.2	ELISA zum Nachweis des löslichen Maus-FasL	23
II.1.5.3	Proliferationstest mittels Inkorporation von ³ H-Methyl-Thymidin	23
II.1.5.4	JAM-Test zum Nachweis von Apoptose	24
II.1.5.5	Apoptoseinduktion durch einen agonistischen anti-Fas-Antikörper	26
II.1.5.6	Blockierung der Apoptoseinduktion durch einen blockierenden anti-FasL-Antikörper	26
II.1.5.7	Überstandstransfer-Experimente	26
II.2	Virale Methoden	28
II.2.1	Expression von FasL unter Verwendung des induzierbaren Cre/loxP-Systems	28
II.2.2	Vermehrung der Adenoviren	29
II.2.3	Dichtegradienten-Zentrifugation zur Anreicherung der Adenoviren	29
II.2.4	TCID ₅₀ -Methode zur Virusquantifizierung	30
II.3	Molekularbiologische Methoden	31

II.3.1	Isolierung und Quantifizierung der Gesamt-RNA.....	31
II.3.2	RT-PCR.....	31
II.3.2.1	Reverse Transkription der RNA.....	31
II.3.2.2	Amplifizierung des Maus-FasL.....	32
II.3.3	Gelelektrophorese	33
III	Ergebnisse	34
III.1	Charakterisierung unreifer und reifer DC nach Differenzierung aus Monozyten	34
III.2	Adenovirale Transduktion von humanen DC mit Maus-FasL	36
III.2.1	Nachweis von Maus-FasL mittels RT-PCR.....	36
III.2.2	Nachweis des Maus-FasL auf der Oberfläche humaner DC mit Durchflusszytometrie.....	37
III.2.2.1	Kinetik der FasL-Expression und Apoptoseinduktion nach Transduktion von iDC und mDC	40
III.2.2.2	Löslicher Maus-FasL	42
III.2.3	Phänotyp und Funktionalität transduzierter DC.....	43
III.2.3.1	Phänotyp EGFP-transduzierter iDC und mDC	43
III.2.3.2	Funktionelle Analyse der EGFP-transduzierten iDC und mDC.....	45
III.2.3.3	Phänotyp FasL-transduzierter reifer DC	46
III.2.3.4	Expression von Maus-FasL und humanem FasL auf transduzierten mDC	47
III.3	Funktionalität FasL-transduzierter DC	48
III.3.1	Induktion von Apoptose bei Jurkat T-Zellen	48
III.3.1.1	JAM-Test zum Nachweis von Apoptose.....	48
III.3.1.1.1	Dosisabhängigkeit der Apoptoseinduktion durch mDC-FasL	50
III.3.1.2	Durchflusszytometrischer Nachweis der Apoptoseinduktion bei Jurkat T-Zellen.....	51
III.3.1.3	Blockierung der FasL-induzierten Apoptose	53
III.4	Eliminierung primärer humaner T-Lymphozyten nach polyklonaler Aktivierung	55
III.4.1	Eliminierung aktivierter T-Lymphozyten durch mDC-FasL	55
III.4.1.1	Proliferation und Apoptose von primären T-Zellen in Kokulturen mit mDC-FasL.....	55
III.4.2	Untersuchung aktivierter T-Zellsubpopulationen	58
III.4.2.1	Aktivierungsmarker auf aktivierten CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen.....	58
III.4.2.2	Proliferation aktivierter T-Lymphozyten in Kokulturen mit mDC-FasL.....	60
III.4.2.3	Apoptoseinduktion bei aktivierten T-Zellsubpopulationen durch mDC-FasL.....	61
III.4.2.4	Inhibierung der mDC-FasL-vermittelten Apoptose bei aktivierten T-Lymphozytensubpopulationen ..	62
III.4.2.5	Proliferation von aktivierten T-Lymphozytensubpopulationen in Kokulturen in Anwesenheit eines blockierenden anti-FasL-Antikörpers	64
III.4.2.6	Überstandstransfer-Experimente.....	65
III.5	Eliminierung allogener aktivierter humaner T-Lymphozyten.....	67
III.5.1	Proliferation allogener aktivierter T-Lymphozyten in Kokulturen mit mDC-FasL	67
III.5.2	Apoptoseinduktion bei alloreaktiven T-Lymphozyten in Kokulturen mit mDC-FasL	68
IV	Diskussion	70
IV.1	Dendritische Zellen als antigenpräsentierende Zellen.....	70
IV.1.1	<i>In vitro</i> Generierung von DC aus humanen Monozyten	70
IV.1.2	Reifung dendritischer Zellen	72
IV.1.3	Adenovirale Transduktion humaner DC.....	73
IV.2	Generierung FasL-exprimierender DC	74
IV.2.1	FasL-exprimierende APC	74
IV.2.2	Transduktion von humanen DC mit FasL unter Einsatz des Cre/loxP-Systems.....	76
IV.2.3	FasL-exprimierende humane dendritische Zellen.....	76
IV.2.4	Speziesübergreifender Einsatz von Maus-FasL bei humanen Zellen	77
IV.3	Funktionalität FasL-exprimierender mDC	78
IV.3.1	Eliminierung von Jurkat T-Zellen.....	78
IV.3.2	Eliminierung primärer humaner T-Lymphozyten.....	80

IV.3.3	Rolle des löslichen FasL bei der Apoptoseinduktion.....	83
IV.3.4	Eliminierung allogen aktivierter T-Zellen	86
IV.4	Potenzielle therapeutische Anwendung von mDC-FasL bei T-zellabhängigen Erkrankungen.....	87
IV.4.1	Indirekte Toleranzinduktion durch den Einsatz von mDC-FasL	91
IV.5	Ausblick	92
V	Literatur	94
VI	Zusammenfassung	112
VII	Summary	114
VIII	Anhang	115
VIII.1	Medien, Puffer und Lösungen	115
VIII.2	Anbieterverzeichnis	117
IX	Veröffentlichungen	119
	Bedanken möchte ich mich bei.....	120

Abkürzungen

µg / µl	Mikrogramm, Mikroliter
³ H-Methyl-Thymidin	Tritium-markiertes Thymidin
Abb.	Abbildung
ACID	<i>activation induced cell death</i>
APC	<i>antigen presenting cell</i>
APC-FasL	FasL-exprimierende APC
Bp	Basenpaare
CAD	<i>capase-activated DNase</i>
CAR	Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor
CCR	Chemokinrezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD40L	CD40-Ligand
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cpm	<i>counts per minute</i>
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt
CTLA-4	<i>CTL-associated protein-4</i>
DC	dendritische Zelle(n)
DD	<i>death domain</i>
DED	<i>death effector domain</i>
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dubleco's minimal essential media</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E:T	Effektor-Target
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	Enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest
FACS	<i>fluorescent-activated cell sorter</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FasL	Fas Ligand
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i>
GAD65	Glutaminsäuredecarboxylase von 65 kDa
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
h	<i>hours</i>
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
ICAD	<i>inhibitor of capase-activated DNase</i>
ICOS-Ligand	Ligand des <i>inducible co-stimulator</i>
iDC	unreife (<i>immature</i>) dendritische Zelle(n)
IFN _γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

ITR	<i>inverted terminal repeat</i>
JAM	<i>just another method</i>
kb	Kilo-Basen
kDa	Kilo-Dalton
LAMP-1	<i>lysosomal associated membran protein-1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MACS	<i>magnetic cell sorting</i>
MBP	<i>myelin basic protein</i>
MCM	<i>monocyte conditioned media</i>
MCM	<i>monocyte conditioned medium</i>
MCMV	Cytomegalovirus der Maus
mDC	reife (<i>mature</i>) dendritische Zelle(n)
mDC-EGFP	reife (<i>mature</i>) dendritische Zelle(n) transduzierte mit EGFP
mDC-FasL	reife (<i>mature</i>) dendritische Zelle(n) transduziert mit Maus- FasL
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
MLR	<i>mixed leukocyte reaction</i>
MNC	Mononukleäre Zellen
MOI	<i>multiplicity of infection</i> (Viruspartikel pro Zelle)
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PGE ₂	Prostaglandin-E ₂
PI	Propidiumjodid
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse PCR
SD	Standardabweichung
sFasL	löslicher Fas Ligand (<i>soluble FasL</i>)
SSC	<i>sideward scatter</i>
TAE	<i>Tris Acid EDTA</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TGF-β	<i>transforming growth factor- β</i>
TNF-α	<i>tumor nekrosis factor-α</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP nick end labeling</i>
U	<i>unit</i> (Einheit)
UPM	Umdrehungen pro Minute

I Einleitung

I.1 Das Immunsystem

Das „Immunsystem“ bezeichnet ein Organsystem, das sich aus einer Vielzahl hochspezialisierter Zellen zusammensetzt, die durch den Körper patrouillieren, um Krankheitserreger sowie entartete Körperzellen zu erkennen und zu beseitigen. Man unterscheidet dabei zwei eng miteinander verbundene Systeme, das angeborene und das erworbene Immunsystem. Beim Eindringen eines pathogenen Erregers kommt es zu einer Aktivierung des aus evolutionärer Sicht älteren, angeborenen Immunsystems, das sich v. a. aus Phagozyten, Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und den von ihnen sezernierten Zytokinen sowie dem Komplementsystem zusammensetzt. Ein wichtiger Pathogenitätsfaktor verschiedener Krankheitserreger besteht darin, dass diese erste Barriere überwunden werden kann und sich die Erreger so im Körper ausbreiten können.

Als Gegenmaßnahme entwickelte sich bei Wirbeltieren das hochspezialisierte erworbene Immunsystem, das sich wiederum in eine humorale und eine zellvermittelte Immunantwort unterscheiden lässt. Die humorale Immunantwort wird von spezifischen Antikörpern vermittelt, die von B-Lymphozyten sezerniert werden. Sind Pathogene mit Antikörpern opsonisiert, können diese durch Phagozyten erkannt und aufgenommen werden. Bei der zellvermittelten Immunantwort werden bakteriell oder viral infizierte sowie entartete körpereigene Zellen von CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) erkannt und durch Lyse beseitigt. Ein wichtiges Bindeglied bei der Interaktion von angeborenem und erworbenem Immunsystem sind dendritische Zellen (DC; Liu, 2001). Es handelt sich dabei um „professionelle“ antigenpräsentierende Zellen (APC), die pathogenes Material aufnehmen, prozessieren und den T-Lymphozyten präsentieren können (Guermontprez *et al.*, 2002).

Das gegenwärtig favorisierte Konzept zur Funktion von DC geht davon aus, dass die Aufnahme pathogenen Materials Reifung bei den DC induziert, worauf sie aus dem Gewebe in den nächstgelegenen drainierenden Lymphknoten einwandern (Banchereau & Steinman, 1998). Während der Migration reifen die DC vollständig aus (Randolph, 2001). Dies geht einher mit der Prozessierung von Antigenen zu kurzen Peptidsequenzen, die dann über MHC (*major histocompatibility complex*) -Klasse-I- und -Klasse-II-Moleküle den T-Lymphozyten präsentiert werden (Watts, 1997), sowie mit der verstärkten Expression von kostimulatorischen Molekülen auf der Zelloberfläche (Sharpe & Freeman, 2002). Die so ausgereiften DC wandern in die parakortikalen T-Zellzonen des Lymphknotens ein, wo es

zum Kontakt zwischen naiven T-Lymphozyten und den reifen DC kommt, und so eine spezifische Immunantwort initiiert wird.

Eine CD4⁺ T-Helferzelle kann über den T-Zellrezeptor (TCR) das von den DC über MHC-Klasse-II-Moleküle präsentierte Antigen erkennen, was den ersten Schritt in der T-Zellaktivierung darstellt. Für eine vollständige Aktivierung muss der T-Lymphozyt aber auch noch durch kostimulatorische Moleküle insbesondere der B7-Familie oder ICOS-Ligand (*inducible co-stimulator ligand*) stimuliert werden (Chambers, 2001). Ist der CD4⁺ T-Lymphozyt vollständig aktiviert, beginnt die klonale Expansion (Proliferation), die mit der Sekretion von Zytokinen einhergeht. Durch auto- und parakrine Zytokineffekte reift der T-Lymphozyt zu einer CD4⁺ Effektorzelle heran. Diese ist in der Lage, Makrophagen und CD8⁺ CTL zu aktivieren, die als wichtige Effektorzellen den Krankheitserreger beseitigen. Außerdem werden B-Lymphozyten zur Produktion spezifischer Antikörper stimuliert (Jenkins *et al.*, 2001), wobei insbesondere der Wechsel der Immunglobulinklassen von IgM zu IgG sowie die Affinitätsreifung T-zellabhängig erfolgen (Andersson *et al.*, 1998).

Nach der Eliminierung des Antigens im Rahmen einer Immunantwort muss die Anzahl der durch klonale Expansion entstandenen CD4⁺ T-Helferzellen und CD8⁺ CTL reduziert, d. h. die Homöostase wieder hergestellt werden (Jameson, 2002). Einige wenige der CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten (aber auch B-Lymphozyten) differenzieren zu Gedächtniszellen. Sie überleben jahrelang im Körper, um bei erneutem Kontakt mit dem Antigen innerhalb kürzester Zeit eine noch wirksamere sekundäre Immunantwort auslösen zu können (Tanchot *et al.*, 1997; Sprent & Surh, 2002). Der größte Teil der aktivierten T-Lymphozyten wird durch den sogenannten aktivierungsinduzierten Zelltod (*activation-induced cell death*, AICD; Budd, 2001) eliminiert. Dies geschieht durch Apoptose, die durch die Interaktion von Fas (auch CD95 oder APO-1) und Fas Ligand (FasL, auch CD95L oder APO-1L) vermittelt wird. Untersuchungen zeigen, dass die Blockierung von Fas bzw. FasL durch Antikörper eine fast vollständige Inhibition des AICD bewirkt (Alderson *et al.*, 1995; Dhein *et al.*, 1995; Ju *et al.*, 1995). Es werden aber auch andere Mechanismen zur Wiederherstellung der Homöostase über Apoptoseinduktion durch TNF- α (*tumor necrosis factor- α* ; Wallach *et al.*, 1999) oder TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*; Griffith & Lynch, 1998), aber auch durch Mechanismen, die unabhängig von einer Caspasen-Aktivierung ablaufen (Jäättelä & Tschopp, 2003), beschrieben. Zudem kann eine fehlende Versorgung von Lymphozyten mit essentiellen Wachstumsfaktoren zur Apoptose dieser Zellen führen, was als passiver Eliminierungsmechanismus bezeichnet wird (Guo & Bruce, 1999).

I.1.1 Toleranz

Das Immunsystem ist ein hochspezialisiertes Zellsystem zur Bekämpfung pathogener Keime und entarteter Körperzellen. Doch wie unterscheidet es zwischen körpereigenen und fremden Antigenen? Zur Beschreibung dieser Fähigkeit wurde der Begriff der Toleranz geprägt, der durch die folgenden Kriterien definiert ist: (a) Das Immunsystem antwortet nicht auf ein spezifisches Antigen oder mehrere spezifische Antigene, wobei (b) keine generelle, durch endogene oder exogene Einflüsse induzierte Immunsuppression vorliegen darf. Ein wesentlicher Gesichtspunkt ist jedoch, dass (c) eine Immunantwort gegenüber relevanten Antigenen trotzdem initiiert werden kann. Prinzipiell unterscheidet man zwischen zentraler und peripherer Toleranz.

Durch zentrale Toleranz wird sichergestellt, dass nur reife Lymphozyten die primären lymphatischen Organe verlassen (T-Lymphozyten aus dem Thymus und B-Lymphozyten aus dem Knochenmark), die keine präsentierten Autoantigene erkennen (Kishimoto & Sprent, 2000; Palmer, 2003). Weisen Lymphozyten eine hohe Affinität gegenüber einem Autoantigen auf, sind sie potenziell autoreaktiv und werden daher durch Apoptose zerstört (negative Selektion). Viele Autoantigene werden jedoch nur gewebsspezifisch gebildet und deshalb nicht in den primären lymphatischen Organen von APC präsentiert. Daher ist die zentrale Toleranz nicht ausreichend, um autoreaktive T-Lymphozyten vollständig zu eliminieren. Zudem sind andere Antigene durchaus nützlich, wie z. B. kommensale Bakterien im Darm, und sollen daher nicht vernichtet werden. Zur Vermeidung von Autoreaktivität gegenüber gewebsspezifischen bzw. nützlichen Antigenen müssen deshalb auch Mechanismen existieren, die in der Peripherie Toleranz induzieren können (Mondino *et al.*, 1996). Die periphere Toleranz wird im Gegensatz zur zentralen Toleranz hauptsächlich durch positive Selektion vermittelt, wobei die Aktivität eines T-Lymphozyten mit hoher Bindungsaffinität für ein präsentiertes Antigen reguliert wird.

Es gibt verschiedene Mechanismen, durch die periphere Toleranz vermittelt werden kann. Zum einen können APC in Geweben Autoantigene präsentieren, ohne den T-Lymphozyten ausreichend Kostimulation zu liefern (Mahnke *et al.*, 2002), was zu einer Anergie führen kann (Lutz & Schuler, 2002; Appleman & Boussiotis, 2003). Anergische T-Lymphozyten sind funktionell inaktiv und können bei einem erneuten Kontakt mit dem Antigen trotz kostimulatorischer Signale nicht auf das Antigen antworten (Colombetti *et al.*, 2002; Schwartz, 2003). Zum anderen kann periphere Toleranz auch durch sogenannte regulatorische

T-Lymphozyten vermittelt werden (Shevach, 2001). Derzeit am Besten untersucht ist die Subpopulation der $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen, die unabhängig von einem spezifischen Antigen die Aktivierung und Effektorfunktionen von T-Lymphozyten unterdrücken können. Humane regulatorische T-Zellen können durch wiederholte Stimulation mit unreifen DC *in vitro* generiert werden (Jonuleit *et al.*, 2000a). Zahlreiche Tiermodelle zeigen, dass $CD4^+CD25^+$ T-Lymphozyten *in vivo* Effektorzellen inhibieren können (Jonuleit *et al.*, 2003). Die Kreuzpräsentation von Autoantigenen und gleichzeitigem Apoptosestimulus gilt als ein Mechanismus zur Deletion autoreaktiver $CD8^+$ CTL (Kurts *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 1998).

Ein weiterer Mechanismus peripherer Toleranz ist die klonale Deletion durch Fas-vermittelte Apoptose. T-Lymphozyten können nach wiederholter Antigenstimulation durch auto- oder parakrine Apoptoseinduktion eliminiert werden (Dhein *et al.*, 1995). Auch eine Deletion aktivierter T-Lymphozyten durch FasL-exprimierende Makrophagen und DC ist dokumentiert (Badley *et al.*, 1996; Süss & Shortman, 1996).

Durch die Präsentation von Autoantigenen spielen DC eine wichtige Rolle bei der Vermittlung zentraler und peripherer Toleranzmechanismen (Steinman & Nussenzweig, 2002). Dabei ist die Inhibierung bzw. das Ausschalten von autoreaktiven $CD4^+$ T-Helferzellen ein effektiver Mechanismus, um Toleranz gegenüber einem Autoantigen zu erzielen (Fathman *et al.*, 2000). Während einer Immunreaktion hat diese T-Lymphozytensubpopulation eine zentrale Vermittlerrolle zwischen der hochspezifischen humoralen und der zellvermittelten Immunantwort, weshalb diese Zellen ein bevorzugtes Ziel der Toleranzmechanismen darstellen.

I.1.2 Autoimmunkrankheiten

Toleranz gegenüber Autoantigenen ist ein grundlegender und fein regulierter Mechanismus des gesunden Immunsystems. Störungen dieses Systems können schwerwiegende Folgen für einzelne Organe oder den gesamten Organismus haben. Kommt es z. B. durch eine bakterielle oder virale Infektion zur Reifung von autoantigenpräsentierenden DC (Ohashi & DeFranco, 2002), kann es durch die Präsenz kostimulatorischer Signale zur vollständigen Aktivierung autoreaktiver T-Lymphozyten kommen (Turley, 2002). Dies bezeichnet man als Autoimmunität. Sie zeichnet sich durch Produktion von Antikörpern oder Aktivierung und Expansion von T-Zellen gegen autologe Zellen, Proteine oder Gewebe aus (Ermann &

Fathman, 2001). Dies ist ein Mechanismus, der normalerweise ohne Folgen für den Organismus verläuft. So lassen sich Autoantikörper und autoreaktive T-Lymphozyten häufig passager bei Patienten mit Infektionskrankheiten nachweisen (Zandman-Goddard & Shoenfeld, 2002). Anders ist es jedoch bei der Ausbildung einer Autoimmunkrankheit, bei der die Selbstreaktivität der Lymphozyten bzw. die Bildung von Autoantikörpern zu einer Gewebszerstörung führt (Lipsky, 2001).

Die Entstehung von Autoimmunkrankheiten kann durch genetische Prädisposition (Wanstrat & Wakeland, 2001), Umweltfaktoren (Ermann & Fathman, 2001) und/oder Defekte der Immunregulierung begünstigt sein, wobei die einzelnen Faktoren abhängig vom Individuum oder der Krankheit mehr oder weniger stark ins Gewicht fallen. Defekte in der Immunregulation können verschiedene Autoimmunkrankheiten verursachen, wobei Mutationen des Fas-FasL-Signalweges eine besonders wichtige Rolle spielen (Mountz *et al.*, 1994; Puck & Sneller, 1997; Rieux-Laucat *et al.*, 2003). Weitere Auslöser von Autoimmunkrankheiten können sogenannte Superantigene sein, die bei bakterieller oder viraler Infektion in den Körper gelangen und zur unspezifischen Aktivierung von u.a. auch autoreaktiven Immunzellen führen (Fleischer, 1994; Labrecque *et al.*, 1994). Außerdem können virale Proteine durch molekulare Mimikry Immunantworten gegenüber Autoantigenen induzieren. Weiterhin können Autoimmunkrankheiten durch virale Infektionen wie z. B. mit dem Epstein-Barr-Virus ausgelöst werden. Dabei kann es zu einer polyklonalen Expansion von T-Lymphozyten kommen, wobei die dabei sezernierten Zytokine unspezifisch B-Zellen zur Bildung von Autoantikörpern stimulieren können.

I.2 Apoptose

Apoptose ist ein zentraler Mechanismus zur Eliminierung von Zellen während der Embryonalentwicklung, Homöostase sowie der Kontrolle von Tumoren und Funktionen des Immunsystems. Dabei kann Apoptose über zwei prinzipielle Signalwege initiiert werden: Der intrinsische Signalweg geht von den Mitochondrien aus, der extrinsische Signalweg wird durch die Aktivierung von Todesrezeptoren über die Bindung der korrespondierenden Liganden vermittelt (Hengartner, 2000).

Der Zelltod durch Apoptose ist klar von der Nekrose zu unterscheiden. Bei der Nekrose handelt es sich um eine initial noch reversible, nicht energieabhängige Zerstörung einer Zelle, die durch mechanische oder chemische Reize ausgelöst werden kann (Kroemer *et al.*, 1998).

Das morphologische Bild der Nekrose zeigt Zellen, die zunächst anschwellen und anschließend ihre Membranintegrität verlieren. Hingegen ist Apoptose ein energieabhängiger Prozess, der nach Induktion irreversibel ist. Morphologisch ist bei einer apoptotischen Zelle zunächst ein Schrumpfen des Zytoplasmas zu beobachten, das von einer Chromatinkondensation im Kern begleitet wird. Es entstehen von der Zellmembran umschlossene kleine Körperchen (sogenannte „*apoptotic bodies*“). Im weiteren Verlauf werden die Zellen sekundär nekrotisch, d. h. auch sie verlieren in einem späten Stadium der Apoptose ihre Membranintegrität. Die Apoptose von Zellen ist ein streng regulierter Prozess, der extrinsisch insbesondere durch die Bindung von Liganden der TNF-Superfamilie an die entsprechenden Rezeptoren ausgelöst wird (Schulze Osthoff *et al.*, 1998). Auf biochemischer Ebene geht die Auslösung der Apoptose mit der Aktivierung der Caspasen-Kaskade (Cohen, 1997), der Translokation von Phosphatidylserin zur Außenseite der Zellmembran (Vermees *et al.*, 1995), sowie der enzymatischen Spaltung genomischer DNA in internukleosomale Fragmente einher (Nagata, 2000).

Die Rezeptoren der TNF-Superfamilie haben unterschiedliche physiologische und pathophysiologische Funktionen und nicht ausschließlich apoptoseinduzierende Wirkung. Als Beispiel sei hier der TNF-Rezeptor 1 genannt, der neben einer aktivierenden Funktion bei der Proliferation naiver T-Lymphozyten auch als Todessignal wirken kann, das bei der Deletion aktivierter T-Lymphozyten eine wichtige Rolle spielt (Budd, 2002; Aggarwal, 2003). Dieses Beispiel zeigt, dass das Signal der Rezeptoren der TNF-Superfamilie intrazellulär entscheidend moduliert wird. Den apoptoseauslösenden Rezeptoren der TNF-Superfamilie ist das Vorhandensein einer „*death effector domain*“ (DED) gemeinsam, durch die intrazellulär die Caspasen-Kaskade aktiviert wird (Tibbetts *et al.*, 2003). Dabei ist die Apoptoseinduktion durch Fas-FasL-Interaktion der am Besten untersuchte Apoptosestimulus (Krammer, 2000).

FasL gehört zur TNF-Liganden-Superfamilie und ist ein Typ-II-Transmembranprotein von etwa 40 kDa (Nagata, 1999). Die Expression des FasL ist genau reguliert, wobei FasL insbesondere auf aktivierten T-Lymphozyten und NK-Zellen, vaskulärem Endothel und in sogenannten immunprivilegierten Organen nachweisbar ist (Gehirn, Augen, Eierstöcken und Hoden; Newell & Desbarats, 1999). In der Schwangerschaft wird der Trophoblast u. a. durch FasL-Expression vor den mütterlichen, Fas-exprimierenden Lymphozyten geschützt (Thellin *et al.*, 2000). Das Auge ist eines der am häufigsten untersuchten immunprivilegierten Organe (Griffith & Ferguson, 1997). Transplantationen der Cornea können auch über die Grenzen der

Kompatibilität hinweg ohne den Einsatz von Immunsuppressiva erfolgreich durchgeführt werden. Entzündungsreaktionen, die für ein großes Organ leicht zu tolerieren sind, wären für das Auge verheerend, da eine Erblindung droht. Daher werden einwandernde Lymphozyten durch FasL-Expression mittels Fas-induzierter Apoptose zerstört (Ferguson *et al.*, 2003).

FasL kann auch in löslicher Form (*soluble FasL*, sFasL) vorliegen. Dabei kann sFasL einerseits bei der Prozessierung durch Metalloproteinasen entstehen (Kayagaki *et al.*, 1995). Andererseits kann funktionell aktiver sFasL in lysosomalen Vesikeln gespeichert und bei Bedarf rasch freigesetzt werden (Bossi & Griffiths, 1999; Martinez-Lorenzo *et al.*, 1999). Die Funktion von sFasL wird kontrovers diskutiert. Einige Publikationen zeigen einen apoptoseinduzierenden Effekt von sFasL (Suda *et al.*, 1996; Schneider *et al.*, 1998), während andere Ergebnisse abhängig von dem jeweils verwendeten Zellsystem auf eine apoptoseinhibierende Wirkung hinweisen (Cheng *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1995; Suda *et al.*, 1997; Schneider *et al.*, 1998).

Der Rezeptor für FasL ist Fas. Es handelt sich um ein Typ-I-Transmembranprotein von 45 kDa, das zur TNF-Rezeptor-Superfamilie gehört (Walczak & Krammer, 2000). Im Körper wird Fas ubiquitär exprimiert, wobei eine starke Expression auf Thymozyten, aktivierten T- und B-Lymphozyten sowie in Hepatozyten, Herz und Nieren nachgewiesen werden kann (Nagata, 1999). Alternative Splicevarianten von Fas besitzen keine Transmembrandomäne und liegen deshalb in löslicher Form vor (Cascino *et al.*, 1995). Lösliches Fas kann FasL binden und inaktivieren (Papoff *et al.*, 1996).

Funktionelle Analysen zeigen, dass Fas für eine Aktivierung zunächst extrazellulär durch FasL-Moleküle trimerisiert werden muss (Schulze Osthoff *et al.*, 1998). Dies führt intrazellulär zur Anlagerung des Adaptermoleküls FADD („*Fas-associated death domain*“) über eine sogenannte „*death domain*“ (DD). Zudem besitzt FADD noch 2 weitere DEDs, an die sich die inaktive Pro-Caspase-8 anlagern kann (Cohen, 1997). Es entsteht der sogenannte „*death-inducing signaling complex*“ (DISC). Durch die Entstehung des DISC wird die Pro-Caspase-8 gespalten und die aktive Form der Caspase-8 entsteht. Diese aktiviert nun autoproteolytisch andere Pro-Caspase-8 Moleküle und weitere untergeordnete Caspasen, wobei diese die morphologisch und funktionell nachweisbaren Änderungen in apoptotischen Zellen induzieren. Es gibt verschiedene Signalkaskaden zur Caspasen-Aktivierung (Scaffidi *et al.*, 1998), jedoch münden alle in der Aktivierung der Caspase-3, die dann ICAD (*inhibitor of*

CAD) spaltet. Ist ICAD durch die Spaltung inaktiviert, wird CAD (*caspase-specific DNase*) aktiviert und beginnt mit der Spaltung der internukleären DNA in Fragmente von ca. 180 Basenpaare (Nagata, 2000).

I.3 Experimentelle Ansätze zur Induktion antigenspezifischer Toleranz

Die Interaktion von DC und T-Lymphozyten spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen oder bei einer Transplantat-Abstoßung. Zur Unterdrückung der Immunreaktionen werden unspezifisch wirkende Immunsuppressiva eingesetzt, die nicht nur die primär zu behandelnde Erkrankung beeinflussen, sondern auch die Reaktionsfähigkeit gegenüber sekundären Infekten vermindern. Dabei müssen die Patienten teilweise lebenslang kostenintensiv mit Medikamenten behandelt werden, die schwere Nebenwirkungen auslösen können (Toungouz *et al.*, 2003). In den letzten Jahrzehnten wurden immer wieder gentherapeutische Studien durchgeführt, um eine auto- oder alloantigenspezifische Toleranz ohne den Einsatz immunsupprimierender Medikamente zu erreichen. Dabei spielen Gentherapien basierend auf immunmodulatorischen Molekülen eine besondere Rolle. So werden *in vivo* neben IL-10 (Oberholzer *et al.*, 2002) auch TGF- β (*transforming growth factor- β* ; Lu *et al.*, 1999), CTLA-4 (*CTL-associated protein-4*; Sonderbye *et al.*, 1998; Takayama *et al.*, 2000) und apoptoseinduzierende Moleküle wie TRAIL (Song *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2003) in Tiermodellen eingesetzt.

Auf Grund der zentralen Stellung des Fas-FasL-Signalweges werden immer wieder experimentelle Ansätze publiziert, die die apoptoseinduzierende Eigenschaft von FasL therapeutisch nutzen. Die direkte Injektion von rekombinantem FasL oder Fas-aktivierenden Antikörpern verursacht jedoch *in vivo* schwere letale Leberschäden und ist daher nicht anwendbar (Ogasawara *et al.*, 1993; Kakinuma *et al.*, 1999). FasL-basierende Therapieoptionen wurden in Untersuchungen zur Induktion von Toleranz gegenüber allogenen Transplantaten eingesetzt (Kang *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998; Swenson *et al.*, 1998; Hartwig *et al.*, 2002; Yolcu *et al.*, 2002; Askenasy *et al.*, 2003; Elhalel *et al.*, 2003). Andere Arbeitsgruppen verwendeten FasL erfolgreich in Tiermodellen zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten oder chronischen Entzündungen (Zhang *et al.*, 1997; Batteux *et al.*, 1999; Fleck *et al.*, 2001).

I.3.1 FasL-exprimierende Killer-APC

Bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen aber auch Transplantat-Abstoßungsreaktionen wäre es wünschenswert, reaktive T-Lymphozyten selektiv auszuschalten. Dies könnte eine antigenspezifische Toleranz induzieren und somit den Einsatz systemisch wirkender Immunsuppressiva überflüssig machen. Einige Arbeiten zum immunmodulierenden Einsatz von FasL beschäftigen sich mit der Herstellung und Anwendung sogenannter FasL-exprimierender „Killer-APC“. In **Abb. 1** ist das Konzept dieser FasL-exprimierenden APC (APC-FasL) dargestellt. Erhält ein T-Lymphozyt von einer APC ausschließlich die Stimulation durch die MHC-TCR-Interaktion, so wird eine funktionelle Anergie induziert (**A**). Erst bei gleichzeitiger Kostimulation wird der T-Lymphozyt vollständig aktiviert, und es erfolgt eine klonale Expansion (**B**). „Killer-APC“ übermitteln neben diesen beiden Signalen noch ein drittes Signal über FasL, so dass ein aktivierter, Fas-exprimierender T-Lymphozyt antigenspezifisch durch Apoptose eliminiert wird (**C**).

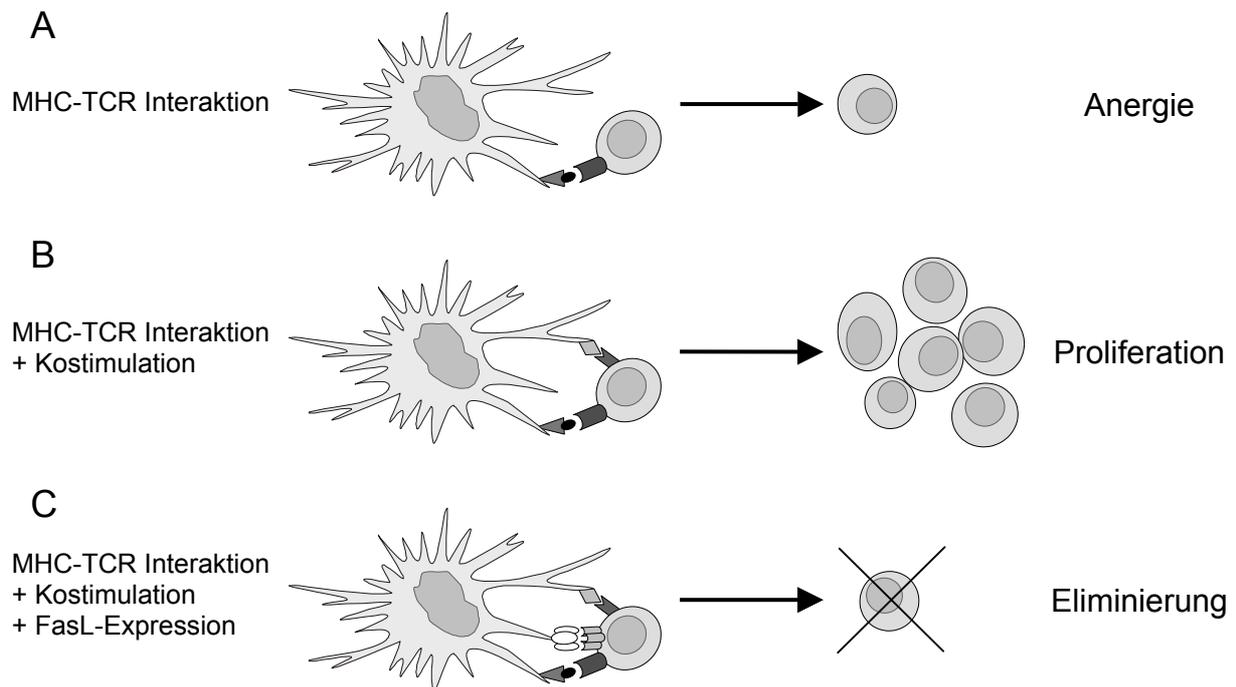


Abb. 1: FasL-exprimierende „Killer-APC“. Erst nach vollständiger Aktivierung der T-Lymphozyten durch Antigenpräsentation (**A**) und Kostimulation (**B**) kommt es zur klonalen Expansion. FasL-exprimierende APC sollen bei den so aktivierten T-Zellen antigenspezifisch Apoptose auslösen (**C**) und somit eine Toleranz gegenüber diesem Antigen induzieren.

Das Konzept der „Killer-APC“ wurde in verschiedenen *in vivo* und *in vitro* Tiermodellen getestet, wobei unterschiedliche professionelle APC eingesetzt wurden. Kosiewicz *et al.* (2002) verwendeten eine B-Zelllinie, andere Untersuchungen wurden mit Makrophagen (z. B. Zhang *et al.*, 1999) oder DC durchgeführt (z. B. Buonocore *et al.*, 2003). Dabei liegt die größte Schwierigkeit darin, dass die APC häufig selbst Fas exprimieren und durch Fas-vermittelte Apoptose ausgeschaltet werden. In den meisten Tiermodellen werden daher APC von Tieren verwendet, die Defekte im Fas-Signalweg aufweisen. Die von diesen Tieren gewonnenen APC sind vor Fas-induzierter Apoptose geschützt (Min *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Buonocore *et al.*, 2003). Eine Arbeitsgruppe verwendete eine DC-Zelllinie zur FasL-Expression, die kein Fas exprimiert, so dass keine Fas-vermittelte Apoptose in den FasL-exprimierenden APC auftreten kann (Matsue *et al.*, 1999; Min *et al.*, 2000; Kusuhara *et al.*, 2002; Wolfe *et al.*, 2002). In anderen Untersuchungen wurden Zelllinien benutzt, deren Fas-Signalweg zuvor inaktiviert wurde (Wu *et al.*, 2001; Kosiewicz *et al.*, 2002).

Die *in vivo* Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen mit FasL-exprimierenden APC zeigen, dass T-Lymphozyten antigenspezifisch eliminiert werden können (Georgantas *et al.*, 2000). Die APC-FasL wurden in einem Modell der rheumatoiden Arthritis (Kim *et al.*, 2002b), in allogenen Transplantationsmodellen (Min *et al.*, 2000; Matsue *et al.*, 2001; Watzlik *et al.*, 2001; Kusuhara *et al.*, 2002) und antigenspezifischen Immunreaktionen getestet (Matsue *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2001; Kosiewicz *et al.*, 2002; Wolfe *et al.*, 2002).

Die vorgestellten Publikationen zeigen vielversprechende Ergebnisse in Bezug auf eine antigenspezifische Eliminierung von reaktiven T-Zellen und zur Induktion einer spezifischen Toleranz *in vivo*. Jedoch liegen bisher noch keine Untersuchungen zu APC-FasL mit primären humanen Zellen vor. Vorarbeiten zu der hier vorgelegten Arbeit wurden anhand eines chronischen Infektionsmodells in Mäusen durchgeführt (Zhang *et al.*, 2000). Dazu wurden FasL-defiziente Mäuse mit dem Cytomegalovirus der Maus (MCMV) infiziert, was zu einer schweren chronischen Entzündung der Lunge, Nieren und Leber führte. Obwohl bereits 2 Wochen nach der Infektion keine Viren mehr nachweisbar waren, konnte selbst nach 8 Wochen keine Besserung der Entzündungsreaktionen festgestellt werden. Eine Verminderung der Entzündungssymptome konnte erst durch die Gabe von MCMV-beladenen, FasL-exprimierenden Makrophagen erreicht werden. Dies zeigt, dass in diesem Modell die T-Lymphozyten antigenspezifisch durch die APC-FasL eliminiert werden können.

Zur Expression des FasL wurden adenovirale Vektoren unter Verwendung des Cre/loxP-Systems generiert (Zhang *et al.*, 1998; Bilbao *et al.*, 1999), da sich die Adenoviren besonders für einen effizienten Gentransfer in eukaryotische Zellen eignen. Die Vermehrung von FasL-kodierenden adenoviralen Vektoren ist allerdings problematisch, da die Vermehrungszelllinie HEK 293 selbst Fas exprimiert und somit empfindlich für Fas-vermittelte Apoptose ist. Deshalb sterben die Zellen durch Fas-vermittelte Apoptose, noch bevor größere Mengen von Adenoviren produziert werden können (Larregina *et al.*, 1998; Watzlik *et al.*, 2000). Durch die Verwendung des Cre/loxP-Systems wird diese Schwierigkeit umgangen, da es nur zu einer funktionellen FasL-Expression kommt, wenn die Rekombinase Cre an den loxP-Restriktionsstellen schneidet und so das FasL-Gen unter den Einfluss des Promotors rückt (Zhang *et al.*, 1998).

I.4 Zielsetzung der Arbeit

Nach dem vorgestellten Prinzip der „Killer-APC“ sollte ein vergleichbares System auch mit primären menschlichen Zellen etabliert werden. Hierzu lagen bisher keine Untersuchungen vor. Als APC sollten dazu aus primären humanen Monozyten *in vitro* differenzierte DC eingesetzt werden, die mit dem FasL-Gen transduziert werden sollten. Im Rahmen einer Kooperation mit H.-G. Zhang und J. D. Mountz (University of Alabama, Birmingham) wurden die adenoviralen Vektoren AxCANCre und AdloxPFasL zur Verfügung gestellt, die eine induzierbare Expression des Maus-FasL unter der Kontrolle des Cre/loxP-Systems ermöglichte (Zhang *et al.*, 1998; Bilbao *et al.*, 1999).

Das erste Ziel der hier vorgelegten Untersuchungen war die Etablierung der Transduktionsmethode, um reproduzierbare Ergebnisse mit FasL-exprimierenden humanen DC zu erreichen. Als Kontrollzellen dienten humane DC, die mit einem adenoviralen Vektor transduziert wurden, der das Gen EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) kodiert. Die adenoviral manipulierten DC sollten dann phänotypisch charakterisiert werden. Des Weiteren sollten die FasL-exprimierenden DC in verschiedenen Kokultivierungsmodellen mit T-Lymphozyten funktionell untersucht werden. Dabei waren Versuche sowohl mit Jurkat T-Zellen als auch primären humanen T-Lymphozyten vorgesehen.

II Material und Methoden

Die Zusammensetzung aller verwendeten Medien, Puffer und Lösungen (VIII.1) sowie die Hersteller der verwendeten Produkte und Reagenzien sind im Anhang gesondert aufgeführt (VIII.2).

II.1 Zellbiologische Methoden

II.1.1 Grundlegende Techniken

Alle Arbeiten mit Zelllinien, primären Zellen sowie Virusvermehrungen, Transduktionen und die funktionellen Analysen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt (Lamin Air UVF, 6.12 S, Relatec).

II.1.1.1 *Kultivierung von Zellen*

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Zelllinien sowie die primären Zellen in einem Zellkulturschrank (CO₂-Inkubator CD210, Binder) bei einer Luftfeuchtigkeit von 95%, einem CO₂-Gehalt von 7,5% und bei einer Temperatur von 37°C kultiviert. Alle funktionellen Analysen der verschiedenen Zellen und die Vermehrung der Adenoviren wurden unter diesen Bedingungen inkubiert.

II.1.1.2 *Zentrifugation von Zellen*

Die Zentrifugationen der Zelllinien und der Primärzellen wurden bei 300x g für 10 Minuten bei 18°C durchgeführt (Omnifuge 2.0RS oder Tischzentrifuge Biofuge fresco, beide Heraeus Sepatech, Kendro). Abweichungen davon sind bei den jeweiligen Methoden angegeben.

II.1.1.3 *Ermittlung der Zellzahl durch Trypanblau-Ausschlussfärbung*

Zur Ermittlung der Zellzahl wurde ein Zellaliquot in einer Lösung von 0,4% (w/v) Trypanblau (Sigma) in 0,9% (w/v) NaCl (Merck) in Aqua bidest. seriell verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer mit Hilfe eines Mikroskops (Axiovert 25, Zeiss) ausgezählt. Diese Methode erlaubt eine Unterscheidung von lebenden und toten Zellen, da nur abgestorbene Zellen eine Blaufärbung auf Grund fehlender Membranintegrität aufweisen. Die Berechnung der Zellzahl/ml wurde nach folgender Formel vorgenommen:

$$\frac{\text{Anzahl der Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Großquadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10.000 = \text{Zellzahl/ml}$$

Die angegebenen Zellzahlen beziehen sich jeweils auf die Anzahl lebender Zellen.

II.1.1.4 *Autologes Plasma*

Zur Supplementierung von Kulturen primärer T-Zellen (z.B. zur Aktivierung oder in einem Proliferationstest) sowie zur Lagerung von Primärzellen in flüssigem Stickstoff wurde ausschließlich autologes Plasma eingesetzt, das als Restmenge aus der Elutriation (II.1.3.1) gewonnen wurde. Das Plasma wurde zunächst hitzeinaktiviert (30 Minuten im Wasserbad bei 56°C) und anschließend zum Entfernen der Schwebstoffe zentrifugiert (800x g, 15 Minuten, 18°C). Aliquots des Plasmas wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

II.1.2 Zelllinien

II.1.2.1 *Jurkat T-Zellen*

Jurkat T-Zellen, ein humanes T-Zelllymphom, wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) erworben und in RPMI-komplett Medium (VIII.1) kultiviert. Die Suspensionszellen wurden alle 2 bis 3 Tage in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:5 je nach Bedarf geteilt und mit frischem Medium versetzt. Alle funktionellen Analysen mit Jurkat T-Zellen wurden in diesem Medium durchgeführt.

Darüber hinaus wurden Zellaliquots mit Einfriermedium aus 50% (v/v) RPMI-komplett, 40% (v/v) hitzeinaktiviertem FCS (PAA) und 10% (v/v) DMSO (Sigma) versetzt, schrittweise auf -80°C abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

II.1.2.2 *HEK 293 Zellen*

Die adhärente, embryonale Nierenzelllinie HEK 293 (Clontech) wurde zur Vermehrung von vermehrungsdefizienten EA1-deletierten Adenoviren eingesetzt, da sie deren Genom mit den EA1-Produkten komplettiert. Alle 3-4 Tage wurde die Zelllinie bei einer Konfluenz von 90% je nach Bedarf in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:5 geteilt. Dazu wurden die HEK 293 Zellen

mit 1 x Trypsin/EDTA (PAA) in PBS (PAN) abgelöst, mit Medium versetzt, zentrifugiert und in neuen T175 Kulturflaschen (Falcon, BD) mit DMEM-komplett Medium (VIII.1) kultiviert. Zur Lagerung von Zellaliquots wurden diese mit Einfriermedium aus 50% (v/v) DMEM-komplett, 40% (v/v) hitzeinaktiviertem FCS (PAA) und 10% (v/v) DMSO (Sigma) versetzt, langsam auf -80°C abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

II.1.3 Primärzellen

II.1.3.1 *Elutriation zur Gewinnung von Monozyten und T-Lymphozyten*

Von gesunden Spendern (insgesamt 26 verschiedene männliche und weibliche Spender) wurden durch Leukapherese (Blutzellseparator CS 3000 plus, Baxter) mononukleäre Zellen (MNC) gewonnen. Dabei wurde das Blut in eine erythrozytenreiche Fraktion, die dem Spender zurückgegeben wurde, sowie eine erythrozytenarme Fraktion aufgetrennt. Aus letzterer wurden mittels Dichtegradienten-Zentrifugation die MNC gewonnen. Diese Zellen wurden mit einer Spezialekammer in einer J6-MC Zentrifuge (Beckman) einer Elutriation unterzogen. Es handelte sich dabei um eine Gegenstrom-Zentrifugation, bei der die verschiedenen MNC gemäß ihrer Größe und Dichte aufgetrennt und fraktioniert gesammelt werden konnten. Zunächst wurde das System über eine Peristaltikpumpe mit einer 6%-igen H₂O₂-Lösung (in H₂O) für 20 Minuten sterilisiert, anschließend mit PBS (PAN) gespült und die Pumpe mit Hanks'-Lösung (PAN) geeicht. Dazu wurde mit 2500 UPM bei 4°C das geförderte Volumen pro Zeiteinheit in eine Eichgerade gegen die jeweilige Pumpeneinstellung aufgetragen. Nach diesen Vorbereitungen konnte das System bei einer Durchflussrate von 52 ml/Minute mit den MNC aus der Leukapherese in Hanks'-Lösung plus 6% spenderautologem Plasma beschickt werden. Bei einer konstanten Umdrehungszahl der Zentrifuge von 2500 UPM wurden die einzelnen Zellfraktionen durch die Erhöhung der Durchflussrate aufgetrennt und gesammelt. Fraktionen mit besonders hohem T-Lymphozytenanteil wurden bei einer Durchflussrate von 64 ml/Minute erhalten, die Monozytenfraktion konnte bei 111 ml/Minute gewonnen werden. Diese Zellen wurden anschließend mit 300x g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert, in RPMI-minus Medium (VIII.1) aufgenommen und gezählt (II.1.1.3).

Die Reinheit der Monozytenfraktion wurde anhand der Expression von CD14 (**Tab. 1** in II.1.4) durchflusszytometrisch bestimmt, die in der Regel 85-95% betrug.

II.1.3.2 *Generierung von DC aus Monozyten in vitro*

Die durch Elutriation gewonnenen Monozyten wurden mit PBS (PAN) gewaschen und anschließend 10^6 Zellen/ml in einem serumfreien Kulturmedium (CellGro[®] DC, CellGenix) unter Zugabe der Zytokine IL-4 (Promocell) und GM-CSF (Immunex, jeweils 500 U/ml) über 5 bis 7 Tage zu unreifen DC (iDC) differenziert. Nach der Differenzierung wurden die iDC durch Zugabe verschiedener proinflammatorischer Moleküle gereift. Dieser „Cocktail“ wurde von Jonuleit *et al.* (1997) beschrieben und wird heute auch in klinischen Studien zur Reifung von DC eingesetzt. Zu der Kultur der iDC wurden IL-6 (1000 U/ml), IL-1 β und TNF- α (jeweils 10 ng/ml, alle von Promocell) sowie Prostaglandin-E₂ (PGE₂; Minprostin, Pharmacia & Upjohn) für weitere 2 Tage zugegeben und die Kultur nochmals mit IL-4 und GM-CSF (jeweils 250 U/ml) versetzt. Wurden für Experimente auch iDC benötigt, erhielten diese nur IL-4 und GM-CSF und wurden zum gleichen Zeitpunkt wie die reifen DC (mDC) verwendet.

II.1.3.2.1 *Transduktion von DC mit adenoviralen Vektoren*

Nicht und nur leicht adhärente iDC oder mDC wurden aus den Kulturflaschen entnommen und durch Zentrifugation konzentriert. Die Transduktion der DC wurde nach einem modifizierten Protokoll von Gahn *et al.* (2001) durchgeführt. Die Zellen wurden mittels Trypanblau-Färbung (II.1.1.3) gezählt und bis zu einer Konzentration von 6×10^6 DC/ml mit dem alten Kulturmedium versetzt. Diesem alten Kulturmedium wurden zuvor noch IL-4 und GM-CSF (jeweils 500 U/ml) zugesetzt. Nach Zugabe der Adenoviren in einer definierten MOI (*multiplicity of infection*; Viruspartikel pro Zelle) wurden die Zellen für 90 Minuten bei 200x g bei 18°C in 15 ml oder 50 ml Reaktionsgefäßen (Falcon) zentrifugiert. Ohne den Überstand zu entfernen wurden die transduzierten DC in einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ DC/ml in Zellkulturplatten ausgesät (abhängig vom Gesamtvolumen in 48-, 24-, 12- oder 6-Well Platten, Corning Costar) und bis zur Verwendung in diesen belassen.

Experimente mit transduzierten DC wurden in der Regel am dritten Tag nach der Transduktion angesetzt (Ausnahme: kinetische Studie zur Expression von FasL und Apoptoseinduktion (III.2.2.1)). Soweit nicht anders angegeben, wurde für die Transduktionen mit AxCANCre und AdloxPFasL eine MOI von 100 für jeden Vektor eingesetzt. Bei der Transduktion der DC nur mit einem der beiden Vektoren oder dem Kontrollvektor AdEGFP wurde für jeden Vektor eine MOI von 200 eingesetzt.

Zu jedem Experiment mit FasL-exprimierenden DC wurde jeweils der Anteil Maus-FasL⁺ Zellen durchflusszytometrisch ermittelt (II.1.4). In der vorliegenden Arbeit sind nur Experimente dargestellt, bei denen der Anteil FasL⁺-DC >30% war (30 – 80%, Ausnahme:

Transduktionen von iDC). Die Expression des Kontrollvektors AdEGFP wurde jeweils bestimmt und betrug in allen dargestellten Experimenten >65% (65 – 95%).

II.1.3.3 *T-Lymphozyten*

Die T-Lymphozyten wurden während der Elutriation (II.1.3.1) bei einer Durchflussrate von 64 ml/Minute gesammelt. Diese Fraktion enthält einen Anteil von 80-90% CD3⁺ Zellen, was durchflusszytometrisch durch Färbung mit einem anti-CD3-Antikörper (II.1.4) kontrolliert wurde. Die T-Lymphozyten wurden in RPMI-minus Medium (VIII.1) resuspendiert und gezählt (II.1.1.3). Zu dieser Suspension wurden 40% (v/v) autologes hitzeinaktiviertes Plasma sowie 10% (v/v) DMSO (Sigma) gegeben und Aliquots der T-Zellen bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Für die Experimente wurden die T-Zellaliquots aus dem flüssigen Stickstoff genommen, bei 37°C im Wasserbad schnell aufgetaut und in PBS (PAN) gewaschen. Mittels Trypanblaufärbung wurde die Vitalität der aufgetauten Zellen überprüft.

II.1.3.3.1 *Sortieren von T-Lymphozyten in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellsubpopulationen mit dem MACS-System*

Mit Hilfe des MACS-System (*magnetic cell sorting*) wurden frische oder aufgetaute Lymphozyten aus Elutriationsfraktionen durch positive Selektion aufgereinigt. Dazu wurden die Fraktionen mit entgastem MACS-Puffer (80 µl/10⁷ Zellen, VIII.1) versetzt und 15 Minuten bei 2-8°C mit anti-CD4-MicroBeads (20 µl/10⁷ Zellen; Antikörper mit paramagnetischen Partikeln, Miltenyi Biotec) inkubiert, anschließend gewaschen und über eine LS-Säule (Miltenyi Biotec) mit magnetisierbarem Säulenmaterial in ein starkes Magnetfeld geleitet. Dabei wurden die markierten CD4⁺ T-Lymphozyten in der Säule zurückgehalten, nicht markierte Zellen verließen die Säule im Eluat. Nach dem Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld wurden die CD4⁺ T-Zellen aus der Säule gewaschen und nochmals auf eine neue Säule aufgetragen, um durch wiederholte Anreicherung die Reinheit zu erhöhen. Die dabei entstehenden CD4⁻ Eluate wurden mit anti-CD8-MicroBeads (Miltenyi Biotec) inkubiert und CD8⁺ T-Lymphozyten nach dem gleichen Verfahren wie die CD4⁺ T-Zellen aufgereinigt. Im Anschluss an die Aufreinigung wurden die Lymphozyten mit einer FACS-Färbung (II.1.4) auf ihre Reinheit hin untersucht. Die Zellpopulationen bestanden zu ≥ 99% aus CD3⁺/CD4⁺ bzw. CD3⁺/CD8⁺ T-Lymphozyten (**Abb. 2**). Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen mit 50% (v/v) RPMI-minus Medium (VIII.1), 40% (v/v)

autologem Plasma (II.1.1.4) und 10% (v/v) DMSO (Sigma) versetzt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

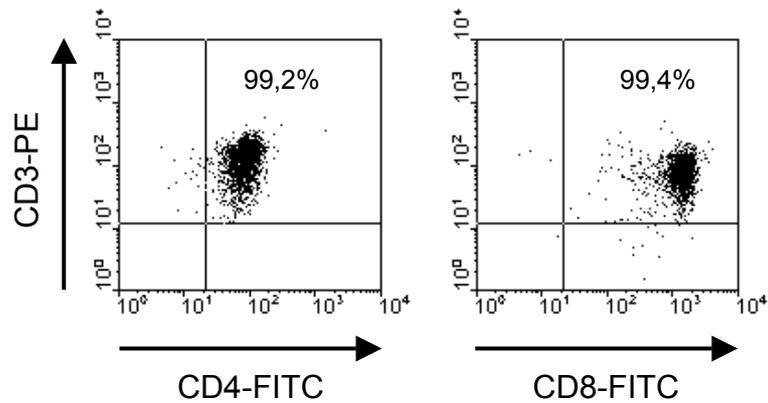


Abb. 2: Reinheit der sortierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten. Unmittelbar nach der positiven Selektion mit anti-CD4- und anti-CD8- MicroBeads (Miltenyi Biotec) wurden die T-Lymphozyten mit Antikörpern gegen die Oberflächenmarker mit FITC-konjugierten anti-CD4- oder anti-CD8-Antikörpern in Kombination mit einem PE-konjugierten anti-CD3-Antikörper gefärbt.

II.1.3.4 *Aktivierung von T-Lymphozyten*

II.1.3.4.1 *Polyklonale Aktivierung von T-Lymphozyten*

Zur Aktivierung wurden nicht sortierte Lymphozytenfraktionen (II.1.3.1) sowie die sortierten T-Lymphozyten (II.1.3.3.1) mit agonistischen Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD3 und CD28 sowie mit dem Zytokin IL-2 polyklonal stimuliert. Dazu wurden zunächst 96-Well Rundboden-Mikrotiterplatten mit einer Lösung aus 10 µg/ml anti-CD3 (Klon OKT3, NaN₃ frei, eBioscience) in 0,1 M Tris pH 9,5 (Merck) beschickt und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die nicht gebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die T-Lymphozyten in RPMI-minus Medium (VIII.1) mit 5% T-zellautologem Plasma (II.1.1.4) sowie mit 1 µg/ml anti-CD28 (Klon CD28.2, NaN₃ frei, eBioscience) und 100 U/ml IL-2 (Promocell) in einem Gesamtvolumen von 200 µl ausgesät. Die T-Lymphozyten wurden für 6 Tage inkubiert, dann vereinigt und in frischem RPMI-minus Medium mit 5% T-zellautologem Plasma zur weiteren Verwendung aufgenommen.

II.1.3.4.2 *Allogene Aktivierung von T-Lymphozyten*

Die allogene Aktivierung wurde in einer gemischten Leukozytenreaktion (MLR, *mixed leukocyte reaction*) durchgeführt. Dabei nutzt man die MHC-Unterschiede zwischen T-Lymphozyten- und DC-Spender (McDevitt, 2000). Durch die Kokultur der beiden Zellpopulationen wird eine allogene Transplantationssituation simuliert, bei der die Aktivierbarkeit von T-Zellen bzw. die Stimulationsfähigkeit der DC getestet werden kann.

Die MLR wurde zum einen als Test für die Funktionalität EGFP-transduzierter iDC und mDC verwendet. Dafür wurden die Kulturen in 96-Well Rundboden-Mikrotiterplatten (Falcon) angesetzt. Nicht sortierte T-Lymphozyten (5×10^4 pro Ansatz, II.1.3.3) wurden für 6 Tage mit den DC (II.1.3.2) eines allogenen Spenders kokultiviert. Dabei wurden verschiedene Stimulator-Responder-Verhältnisse (von 1:625 bis 1:1) in einem Gesamtvolumen von 200 µl RPMI-minus Medium (VIII.1) mit 5% T-zellautologem Plasma (II.1.1.4) angesetzt. Als Kontrollkulturen dienen Ansätze mit T-Lymphozyten, die ohne DC kultiviert wurden. In den letzten 20 Stunden der Kokultur wurde pro Ansatz 1 µCi ³H-Methyl-Thymidin (Perkin Elmer) zugesetzt und der Einbau des markierten Thymidins als Maß für die Proliferation der T-Lymphozyten bestimmt (II.1.5.3).

Zum anderen wurden große MLR-Kulturen mit ruhenden T-Lymphozyten und mDC als optimalen Stimulatorzellen angesetzt, um allogene aktivierte T-Lymphozyten in großen

Mengen zu erhalten. Nicht sortierte T-Lymphozyten (II.1.3.3) wurden für 6 Tage mit mDC (II.1.3.2) eines allogenen Spenders im Verhältnis 1:10 (1×10^5 DC und 1×10^6 T-Zellen) in 48-Well Flachboden-Zellkulturplatten (Falcon) in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml RPMI-minus Medium mit 5% T-zellautologem Plasma kultiviert. An Tag 6 wurden die T-Lymphozyten aus dieser Kultur herausgenommen. Zeitversetzt wurden Monozyten des gleichen DC-Spenders aufgetaut und daraus reife DC generiert (II.1.3.2). Die mDC wurden dann entweder nicht behandelt (mDC) oder mit AdEGFP (mDC-EGFP) bzw. mit AxCANCre plus AdloxPFasL (mDC-FasL) transduziert (II.1.3.2.1). Am Tag 3 nach der Transduktion wurden mDC, mDC-EGFP und mDC-FasL mit den allogen aktivierten T-Lymphozyten für einen Proliferationstest (II.1.5.3) und für eine FACS-Analyse (II.1.3.4.3) kokultiviert.

II.1.3.4.3 *Kokulturen von DC oder Jurkat T-Zellen und T-Lymphozyten für durchflusszytometrische Analysen*

Da für eine durchflusszytometrische Analyse größere Zellzahlen benötigt werden, wurden Kokulturen von DC und Jurkat T-Zellen bzw. T-Lymphozyten in 48-Well Platten angesetzt. Dabei wurden $2,5 \times 10^5$ T-Lymphozyten ausgesät und mit $0,5 \times 10^5$ DC in einem Gesamtvolumen von 500 μ l RPMI-minus Medium (VIII.1) mit 5% T-zellautologem Plasma (II.1.1.4) versetzt. Zur Kontrolle wurden Kulturen von T-Lymphozyten ohne die Zugabe von DC angesetzt. Bei Verwendung von Jurkat T-Zellen wurden diese Ansätze in RPMI-komplett Medium durchgeführt. Die Inkubationsdauer für diese Kokulturen wird bei den Kurzzusammenfassungen der einzelnen Versuche im Ergebnisteil angegeben.

II.1.4 FACS-Analysen zur Phänotypisierung von Monozyten, DC und T-Lymphozyten

Der Phänotyp der verwendeten Zellpopulationen wurde durch Analysen im FACS (*fluorescent-activated cell sorter*) bestimmt. Dazu wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und zweimal mit FACS-Waschpuffer (VIII.1) gewaschen (Zentrifugation bei 300x g für 10 Minuten bei 4°C). Anschließend wurden sie für 30 Minuten mit FACS-Waschpuffer auf Eis inkubiert, um die unspezifische Bindung von Antikörpern und/oder Fluorochromen zu verhindern. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 100 µl FACS-Waschpuffer resuspendiert und nach Zugabe der Antikörper bzw. der entsprechenden Isotypkontrollen (**Tab. 1** und **Tab. 2**) für 30 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wiederum zweimal in FACS-Waschpuffer gewaschen und in 500 µl FACS-Fixativ (VIII.1) aufgenommen. Die Analyse erfolgte mit einem EPICSXL-MCL (Coulter Electronics) Durchflusszytometer. Die Daten wurden mit der frei im Internet erhältlichen Software WinMDI (Version 2.8, <http://facs.scripps.edu>) ausgewertet.

Tab. 1: Monoklonale Antikörper gegen humane Antigene und die entsprechenden Isotypkontrollen.

Spezifität	Fluorochrom	Klon	Isotyp	Hersteller
CD3	PE	HIT3a	Maus IgG ₁	Pharmingen
CD4	FITC	13B8.2	Maus IgG ₁	Immunotech
CD8	FITC	B9.11	Maus IgG ₁	Immunotech
CD14	FITC	MY4-RD1	Maus IgG _{2b}	Coulter Corporation
CD25	PE	CD25-3G10	Maus IgG ₁	Caltag
CD69	PE	CH/4	Maus IgG _{2a}	Caltag
CD80	FITC oder PE	L307.4	Maus IgG ₁	Becton Dickinson
CD83	FITC oder PE	HB15A	Maus IgG _{2b}	Immunotech
CD86	FITC oder PE	BU63	Maus IgG ₁	Caltag
Fas/CD95	PE	DX2	Maus IgG ₁	Pharmingen
FasL/CD95L	PE	NOK-1	Maus IgG ₁	Caltag
HLA-DR	FITC oder PE	TÜ36	Maus IgG _{2b}	Caltag
Isotypkontrolle	FITC oder PE	MOPC-21	Maus IgG ₁	Pharmingen
Isotypkontrolle	FITC	G155-178	Maus IgG _{2a}	Pharmingen
Isotypkontrolle	PE	MG2a04	Maus IgG _{2a}	Caltag
Isotypkontrolle	FITC oder PE	27-35	Maus IgG _{2b}	Pharmingen

Einige Färbungen wurden als Zweifarbenanalysen durchgeführt. Durch die Verwendung von Fluorochromen, die Licht unterschiedlicher Wellenlänge emittieren, wie FITC (Fluoreszeinisothiocyanat) bzw. EGFP und PE (Phycoerythrin), können zwei Merkmale einer

Zelle gleichzeitig analysiert werden. Die Darstellung der Zweifarbenanalysen erfolgt durch logarithmisches Auftragen der beiden Fluoreszenzintensitäten gegeneinander. Die einzelnen Ereignisse bzw. Zellen werden dabei als Punkte dargestellt (Dotplot).

Zum Nachweis des Maus-FasL auf der Oberfläche humaner DC wurde ein Maus-anti-Maus-Antikörper und die entsprechende Isotypkontrolle eingesetzt (**Tab. 2**). Für die Analyse des Maus-FasL auf der Oberfläche der DC war es notwendig, auf eine durchgehende Kühlung bei Inkubationen und Zentrifugationen zu achten. Höhere Temperaturen hätten das Prozessieren des FasL auf der Oberfläche der DC durch endogene Metalloproteinasen begünstigen können.

Tab. 2: Monoklonaler Antikörper gegen Maus-FasL und der entsprechende Isotyp.

Spezifität	Fluorochrom	Klon	Isotyp	Hersteller
FasL/CD95L	PE	Kay-10	Maus IgG _{2b}	Pharmingen
Isotypkontrolle	PE	MPC-11	Maus IgG _{2b}	Pharmingen

II.1.5 Funktionelle Analysen

II.1.5.1 Nachweis von Apoptose durch Färbung mit Annexin V-FITC und Propidiumjodid

Ein frühes Ereignis nach Apoptoseinduktion in einer Zelle ist die Translokation von Phosphatidylserin von der Innenseite der Zellmembran auf deren Außenseite. Die Verschiebung dieses Phospholipids kann durch die Anlagerung des spezifischen Moleküls Annexin V durchflusszytometrisch nachgewiesen werden (Vermes *et al.*, 1995). Da dieses Molekül aber auch in nekrotischen Zellen bindet, muss gleichzeitig mit der Annexin V-Färbung auch noch eine Färbung mit einem DNA-markierenden Farbstoff wie z. B. Propidiumjodid (PI) durchgeführt werden. PI gelangt nur nach Zerstörung der Zellmembran in die Zelle und interkaliert dort in die DNA. Bei dem Auftragen der doppelt gefärbten Zellen als Dotplot kann man drei Zellpopulationen unterscheiden (**Abb. 3**).

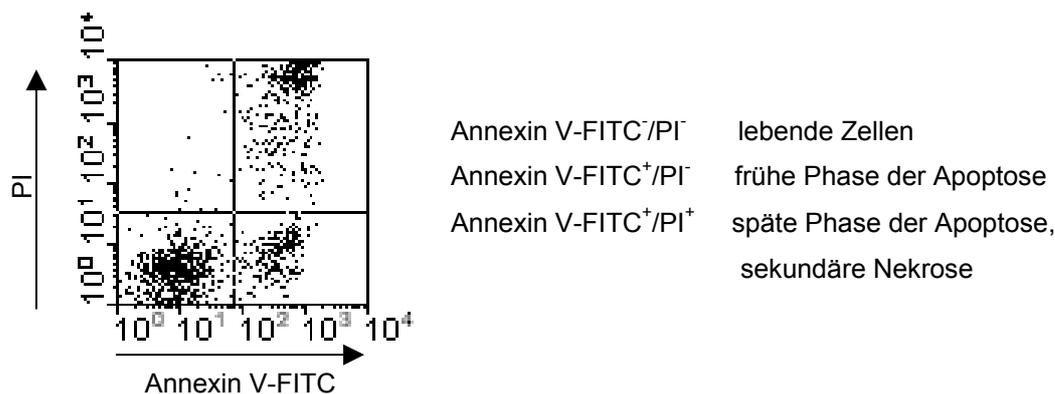


Abb. 3: Annexin V-FITC und Propidiumjodid (PI) Färbung.

Zur Detektion von Apoptose wurden Zellen mit eiskaltem PBS (PAA) zweimal gewaschen (300x g, 10 Minuten, 4°C). Bei der Verarbeitung der Proben ist eine durchgehende Kühlung sehr wichtig, da Apoptose ein enzymatischer, energieabhängiger Prozess ist und durch eine Erhöhung der Temperatur das Ergebnis verfälscht werden kann. Die Proben wurden in 100 µl Annexin V-Bindungspuffer (VIII.1) resuspendiert und mit 10 µl PI Lösung (50 µg/ml in PBS, Sigma) sowie 5 µl Annexin V-FITC (Caltag) für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von weiteren 400 µl Annexin V-Bindungspuffer wurden die Proben innerhalb einer Stunde im Durchflusszytometer (EPICSXL-MCL, Coulter Electronics) analysiert.

Bei der Auswertung der durchflusszytometrischen Daten konnten DC und T-Lymphozyten voneinander unterschieden werden, indem ihre Eigenschaften logarithmisch aufgetragen im „forward scatter“ (FSC, Größe) und „sideward scatter“ (SSC, Granularität) betrachtet

wurden. DC erscheinen dann als eine sehr große und granuläre Population, T-Lymphozyten hingegen sind klein und wenig granulär. Durch diese morphologischen Eigenschaften konnten die T-Zellpopulation im FSC/SSC getrennt und ihre Apoptoseraten eindeutig bestimmt werden.

II.1.5.2 *ELISA zum Nachweis des löslichen Maus-FasL*

Zum Nachweis des löslichen Maus-FasL wurden von den transduzierten DC Kulturüberstände am Tag 3 nach der Transduktion abgenommen und bis zur Bestimmung bei -20°C gelagert. Die Messung erfolgte mit einem ELISA-Kit (R&D) nach den Angaben des Herstellers. Die Nachweisgrenze des ELISAs liegt bei $> 3,1\text{-}3,9$ pg/ml.

II.1.5.3 *Proliferationstest mittels Inkorporation von ^3H -Methyl-Thymidin*

Ein Maß für die Aktivierung von T-Lymphozyten ist ihre proliferative Antwort auf einen Stimulus. Zur Messung dieser Proliferation kann man den Kulturen ^3H -Methyl-Thymidin im Überschuss zugeben, so dass die zelluläre Eigenproduktion vermindert und das markierte ^3H -Methyl-Thymidin in die DNA proliferierender Zellen eingebaut wird. Nach Lyse der Zellen durch Zugabe von destilliertem Wasser wird die DNA freigesetzt und auf Glasfaserfiltern aufgefangen. Die Bestimmung der radioaktiven Zerfälle pro Minute (cpm, *counts per minute*) ist dann ein direktes Maß für die Inkorporation von ^3H -Methyl-Thymidin in die DNA und somit für die Proliferation der Zellen.

In einer modifizierten MLR wurden als Stimulatorzellen DC eingesetzt, die je nach Versuchsaufbau unreif oder reif sowie ohne oder nach Transduktion mit AdEGFP oder AxCANCre plus AdloxPFasL verwendet wurden. In der MLR wurden allogene T-Lymphozyten unstimuliert oder nach polyklonaler Aktivierung (II.1.3.4.1) als Responderzellen verwendet. Genaue Angaben über die verwendeten Stimulator- und Responderzellen sind bei der Beschreibung der einzelnen Experimente aufgeführt. Von den Stimulatorzellen wurden Verdünnungsreihen angesetzt und 80 bis 50 000 Zellen pro Ansatz in 100 μl RPMI-minus Medium (VIII.1) mit 5% T-zellautologem Plasma (II.1.1.4) in 96-Well Rundboden-Mikrotiterplatten (Nunc) ausgesät. Zu den Stimulatorzellen wurden jeweils 5×10^4 T-Zellen zugegeben, so dass sich Stimulator-Responder-Verhältnisse von 1:625 bis 1:1 ergaben. Als Kontrollen dienten Ansätze, bei denen den T-Lymphozyten keine Stimulatorzellen zugegeben wurden. Die jeweilige Inkubationsdauer ist bei den Kurzzusammenfassungen der Versuche im Ergebnisteil angegeben. Zwanzig Stunden vor Ende der Inkubation wurde den Kulturen 1 μCi ^3H -Methyl-Thymidin (0,037 MBq spezifische

Aktivität, Perkin Elmer) zugegeben. Im Anschluss an diese Inkubation wurden die Zellen mit einem Zellernter (Vacusafe IH-280, Innotech) auf Glasfaserfiltermatten (Printed Filtermat B, Wallac Oy) gesaugt. Nach dem Trocknen wurden die Filtermatten in Szintillationsflüssigkeit (Betaplate Scint; Wallac UK) überführt und die cpm in einem Beta-Counter (1450 MicroBeta liquid scintillation counter, Wallac Oy) bestimmt. Alle Ansätze wurden in dreifacher Ausführung angesetzt und als Mittelwert der cpm \pm SD (Standardabweichung) dargestellt.

II.1.5.4 JAM-Test zum Nachweis von Apoptose

Nach Apoptoseinduktion in einer Zelle kommt es zu charakteristischen morphologischen und biochemischen Ereignissen (Hengartner, 2000). Die initiale Aktivierung der Caspasen-Kaskade durch Fas-FasL-Interaktion führt zu einer Aktivierung der CAD, die chromosomale DNA an spezifischen Stellen schneidet (Sakahira *et al.*, 1998; Nagata, 2000). Es gibt verschiedene Methoden zum Nachweis der DNA-Fragmentierung. Häufig durchgeführt werden zum Beispiel die Visualisierung von sogenannten DNA-Leitern mittels Gelelektrophorese (Weis *et al.*, 1995), der Nachweis des sub-G₀/G₁ Peaks mit einer PI-Färbung (Vermees *et al.*, 2000) oder die sogenannte TUNEL-Färbung (Negoescu *et al.*, 1997). Hier wurde der von Matzinger (1991) entwickelte JAM-Test gewählt, da dieser sehr leicht durchzuführen ist, wenn eine Methode wie die Inkorporation von ³H-Methyl-Thymidin (II.1.5.3) bereits etabliert ist. Ergebnisse der Färbung mit Annexin V-FITC und PI und der JAM-Test zur Detektion von Apoptose sind miteinander vergleichbar, da fragmentierte DNA auch in Annexin V⁺ Zellen nachgewiesen werden konnte (Bacso *et al.*, 2000).

Eine schematische Darstellung des JAM-Tests ist in **Abb. 4** dargestellt. Hierbei wird die DNA von Targetzellen mit ³H-Methyl-Thymidin markiert, weswegen nur proliferierende Zellen als Targetzellen verwendet werden können. Wird in einer Zelle (hier Jurkat T-Zellen) mit markierter DNA Apoptose induziert, wird die DNA fragmentiert. Transferiert man die Zellen auf Glasfaserfilter, bleibt in diese nur die intakte, nicht fragmentierte DNA hängen. Die kurzen, durch Apoptoseinduktion entstandenen Fragmente passieren die Filtermatten und werden in der nachfolgenden Messung der cpm nicht erfasst.

Jurkat T-Zellen wurden über nach Nacht mit 1 μ Ci ³H-Methyl-Thymidin (Perkin Elmer) inkubiert, geerntet und durch zweimaliges Waschen mit PBS (PAA) von überschüssigem Thymidin gereinigt. Die markierten Zellen wurden in RPMI-komplett Medium (VIII.1) resuspendiert und eine definierte Zellzahl in einem Volumen von 100 μ l in 96-Well Rundboden-Mikrotiterplatten ausgesät. Zu diesen Targetzellen wurden definierte Mengen an

Effektorzellen in einem Volumen von 100 µl gegeben. Diese Kokulturen wurden für 5 Stunden inkubiert, wie bei einem Proliferationstest geerntet und die cpm bestimmt (II.1.5.3).

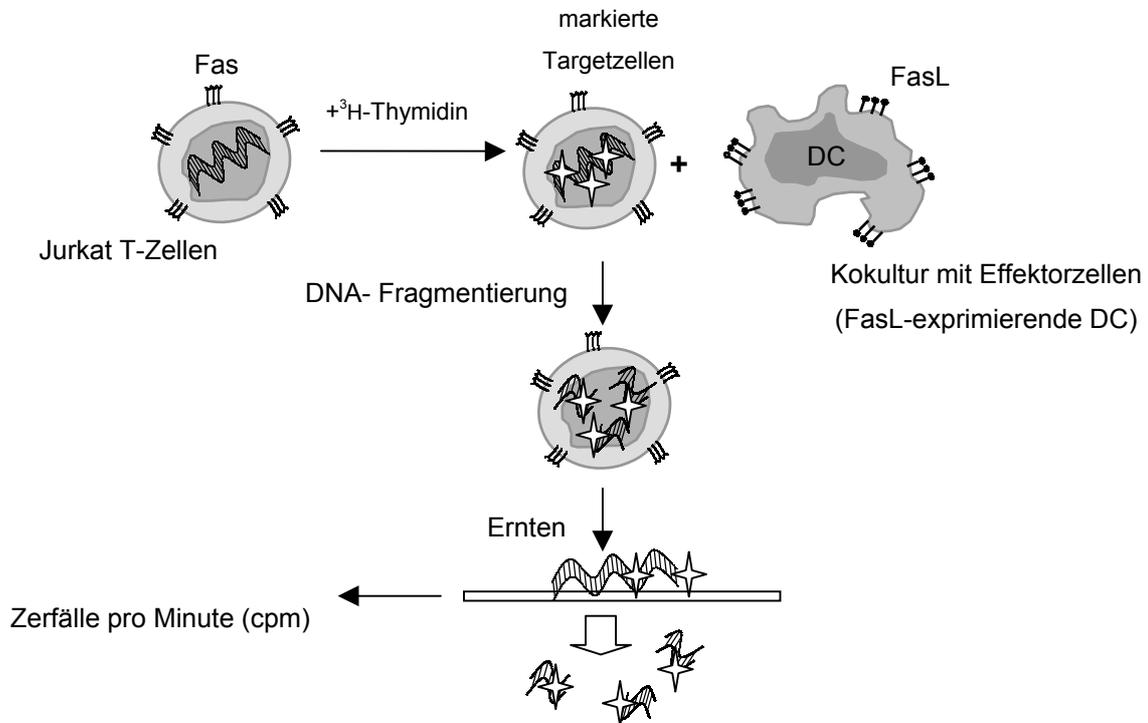


Abb. 4: JAM-Test. Fas⁺ Targetzellen (Jurkat T-Zellen) werden mit ^3H -Methy-Thymidin markiert und mit FasL-exprimierenden DC zusammen kultiviert. Die Apoptoseinduktion in den Targetzellen führt zu einer Fragmentierung der DNA. Beim Ernten der Zellen auf Glasfaserfilter bleibt die nicht fragmentierte DNA hängen, fragmentierte DNA wird durch die Filtermatten gespült. Anschließend werden die radioaktiven Zerfälle bestimmt und die Apoptose relativ zur Kontrollkultur berechnet.

Die Berechnung des prozentualen Anteils der Apoptose relativ zur unbehandelten Kontrollkultur ($\text{cpm}_{\text{unbehandelt}}$) erfolgte nach der folgenden Formel:

$$\frac{\text{cpm}_{\text{unbehandelt}} - \text{cpm}_{\text{experimentell}}}{\text{cpm}_{\text{experimentell}}} \times 100 = \% \text{ Apoptose relativ zur Kontrollkultur}$$

In den Abbildungen sind der Median und die 25 – 75% Percentile von jeweils vierfachen Ansätzen dargestellt.

Weitere JAM-Tests wurden unter Verwendung von Transwells (Nunc) durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Fas-vermittelte Apoptose abhängig vom Zellkontakt ist, und welche Rolle

der sFasL spielt. Es handelt sich dabei um Einsätze, in deren Boden sich eine Membran (Porengröße 0,2 µm) befindet, über die zwischen den beiden Kompartimenten lösliche Stoffe ausgetauscht werden können. Die markierten Jurkat T-Zellen wurden in 150 µl RPMI-komplett Medium in 96-Well Flachboden-Mikrotiterplatten (Costar Corning) ausgesät. In diese Zellsuspension wurden die Transwells eingesetzt und mit den Effektorzellen in einem Volumen von 50 µl beschickt. Als Positivkontrolle wurden 50 µl Medium mit dem agonistischen anti-Fas-Antikörper CH11 (II.1.5.5) in das obere Kompartiment gegeben (Endkonzentration 1 µg/ml). Unbehandelte Kontrollkulturen erhielten nur 50 µl RPMI-komplett Medium. Auch diese Ansätze wurden für 5 Stunden inkubiert.

II.1.5.5 Apoptoseinduktion durch einen agonistischen anti-Fas-Antikörper

Als Positivkontrolle der Fas-vermittelten Apoptose durch FasL-transduzierte DC wurde ein aktivierender anti-Fas-Antikörper (Klon CH11; Upstate) eingesetzt. Es handelt sich dabei um einen Antikörper der Klasse IgM, der die zur Apoptoseinduktion notwendige Trimerisierung von Fas induziert (Yonehara *et al.*, 1989). Der Antikörper wurde in allen Experimenten in einer Endkonzentration von 1 µg/ml eingesetzt.

II.1.5.6 Blockierung der Apoptoseinduktion durch einen blockierenden anti-FasL-Antikörper

Die von FasL-transduzierten DC induzierte Apoptose wurde durch die Zugabe eines Maus-FasL-blockierenden Antikörpers (Klon Kay-10) unterbunden (Kayagaki *et al.*, 1997; Matsue *et al.*, 1999). Als Kontrolle wurde der entsprechende Isotyp (IgG_{2b}, Klon MPC-11; beide Azid frei, Pharmingen) in gleicher Konzentration zu den Kokulturen zugegeben. Die eingesetzten Antikörpermengen sind bei den Versuchsbeschreibungen im Ergebnisteil angegeben.

II.1.5.7 Überstandstransfer-Experimente

Für Transferexperimente wurden die Überstände von transduzierten DC am Tag 3 nach der Transduktion abgenommen. Ein Aliquot des Überstands wurde zur Bestimmung der Menge an Maus-sFasL bei -20°C gelagert und später mittels eines spezifischen ELISA (II.1.5.2) quantifiziert. Die Experimente wurden in einem Gesamtvolumen von 500 µl durchgeführt, wobei $2,5 \times 10^5$ Jurkat T-Zellen bzw. $2,5 \times 10^5$ primäre CD4⁺ oder CD8⁺ T-Lymphozyten in einem Volumen von 100 µl in RPMI-komplett bzw. RPMI- minus Medium (VIII.1) mit 5%

T-zellautologem Plasma (II.1.1.4) ausgesät wurden. Von den Überständen der DC wurden 50, 100, 200, 300 oder 400 µl eingesetzt und das an 500 µl Gesamtvolumen fehlende Medium mit RPMI-komplett (Jurkat T-Zellen) bzw. RPMI-minus Medium mit 5% T-zellautologem Plasma (primäre T-Lymphozyten) aufgefüllt. Ein Ansatz von Jurkat T-Zellen bzw. primären T-Lymphozyten wurde mit 400 µl frischem CellGro Medium plus IL-4 und GM-CSF (beide 500 U/ml) versetzt, um zu untersuchen, ob die Effekte auf die im DC Medium CellGro® enthaltenen Wachstumsfaktoren IL-4 und GM-CSF (II.1.3.2.1) zurückzuführen waren. Die primären T-Lymphozyten und Jurkat T-Zellen wurden mit den Überständen für 24 Stunden inkubiert.

II.2 Virale Methoden

II.2.1 Expression von FasL unter Verwendung des induzierbaren Cre/loxP-Systems

Die Vermehrung des apoptoseinduzierenden Moleküls FasL stellt eine besondere Schwierigkeit dar, weil die zur Vermehrung verwendeten HEK 293 Zellen Fas exprimieren und sensitiv für die Fas-vermittelte Apoptose sind. Bei der Vermehrung von rekombinanten Adenoviren, die die Sequenz für FasL tragen, werden in der Regel nur niedrige adenovirale Titer erzielt. Die Wirtszellen werden durch die Induktion der Fas-vermittelten Apoptose eliminiert, bevor sie größere Mengen an Viren produzieren können (Larregina *et al.*, 1998). Das Cre/loxP-System erlaubt dagegen eine induzierbare Expression von FasL (Anton & Graham, 1995). H.-G. Zhang verwendete es für die Herstellung der adenoviralen Vektorkonstrukte AdloxPFasL und AxCANCre (Zhang *et al.*, 1998), die im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt wurden. Zur Expression des FasL-Gens müssen beide Vektorkonstrukte gleichzeitig eine Zelle infizieren. Der erste Vektor AxCANCre kodiert die Rekombinase Cre, ein Restriktionsenzym, das die 34 Bp große Sequenz loxP erkennt. Der zweite Vektor kodiert das Maus-FasL-Gen in voller Länge (960 Bp), das von loxP-Sequenzen flankiert wird (AdloxPFasL). Befinden sich beide Viren in einer Zelle, kann die Rekombinase Cre den durch die Restriktionsstellen loxP-flankierten Genabschnitt entfernen (**Abb. 5**). Das FasL-Gen gelangt somit unter den Einfluss des Promotors und kann abgelesen werden. Eine Expression von FasL kann also nur nach Doppeltransduktion der Zelle mit AxCANCre plus AdloxPFasL erfolgen. Als Kontrolle wird ein rekombinantes Adenovirus verwendet, das für das fluoreszierende Molekül EGFP kodiert.

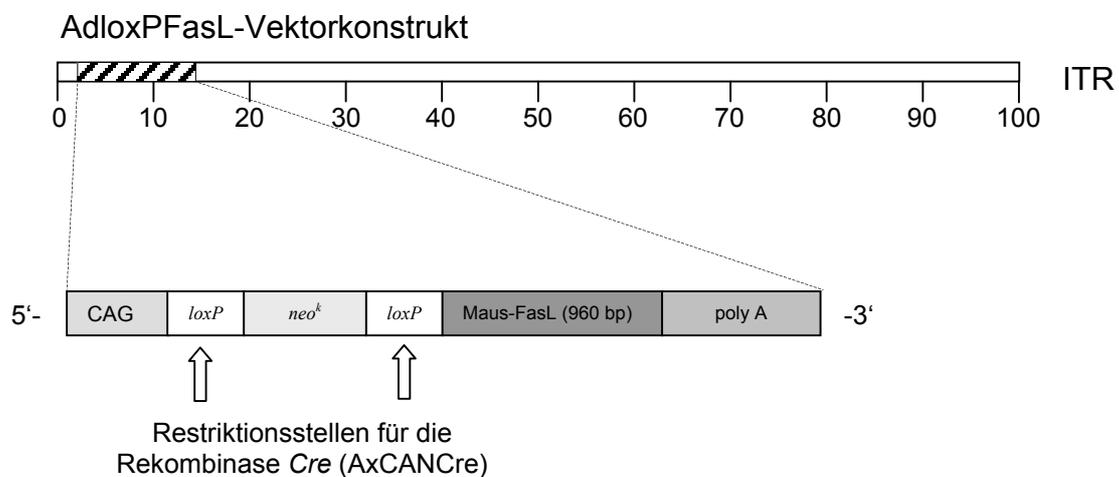


Abb. 5: Das Cre/loxP-Vektorsystem zur Expression von FasL. Abbildung modifiziert nach Zhang *et al.* 1998.

II.2.2 Vermehrung der Adenoviren

Die Adenoviren wurden in HEK 293 Zellen (Clontech) vermehrt (Kultivierung der Zellen s. II.1.2.2). Diese Zelllinie enthält Produkte der viralen EA1-Region zur Komplettierung vermehrungsdefizienter Adenoviren, die sich daher nur in dieser Zelllinie vermehren können. In einer T175 Zellkulturflasche (Falcon, BD) wurden ca. $1,5$ bis 2×10^7 der adhärenenten HEK 293 Zellen ausgesät und am folgenden Tag das Medium gewechselt, um nicht adhärenente Zellen zu entfernen. Am Tag 2 nach der Aussaat hatten die Zellen eine Konfluenz von 80-90% erreicht. Für die Infektion der HEK 293 Zellen wurde zunächst das Medium von den Zellen abgenommen und diese dann mit PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (PAA) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einer möglichst geringen Menge an Medium (10 ml/Flasche) bedeckt, in dem sich die Virussuspension befand. Zur Vermehrung wurde eine MOI von 5-10 eingesetzt. Die Zellen wurden täglich beobachtet, um den optimalen Zeitpunkt der Ernte zu ermitteln. Lösten sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche ab oder zeigte ein Großteil der adhärenenten Zellen eine kugelige Morphologie als Korrelat des zytopathischen Effekts (Dauer ca. 3-4 Tage nach Beginn der Infektion), wurden die Zellen mechanisch vollständig abgelöst. Die erhaltene Zellsuspension wurde zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

II.2.3 Dichtegradienten-Zentrifugation zur Anreicherung der Adenoviren

Das Konzentrieren der Adenoviren nach der Vermehrung war notwendig, da für eine effiziente Transduktion humaner DC hohe MOIs erforderlich sind (Arthur *et al.*, 1997). Die mit Adenovirus infizierten HEK 293 Zellen wurden durch schnelles Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37°C im Wasserbad aufgeschlossen. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Die Suspension mit den Zelltrümmern und den freigesetzten Adenoviren wurde anschließend bei $800 \times g$ für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der virushaltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diese Überstände wurden entweder direkt verwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Die weitere Anreicherung der Adenoviren wurde mittels eines Cäsiumchloridgradienten durchgeführt. Dazu wurden zwei Cäsiumchloridlösungen unterschiedlicher Dichte verwendet: Zunächst wurde in einem Polyallomer Röhrchen (Beckman) 3,5 ml CsCl Lösung (Dichte 1,2 g/ml, VIII.1) vorgelegt und diese dann mit 3,5 ml CsCl (Dichte 1,46 g/ml) unterschichtet. Auf diesen Gradienten wurde ca. 3 ml Überstand der aufgeschlossenen Zellen gegeben und in

einer Ultrazentrifuge (Optima von Beckman) mit einen SW 41 TI Rotor (Beckman) mit 30.000 UPM für 15 Stunden bei 10°C zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde mit Hilfe einer Punktionskanüle (G22) und einer 1 ml Einwegspritze die virusenthaltende Bande aus dem Gradienten gewonnen. Die stark CsCl-haltige Virussuspension wurde in eine Dialysekassette (MW 10.000; Pierce) eingebracht und unter ständigem Rühren bei 4°C in 1x VSB (VIII.1) dialysiert. Der 1x VSB wurde nach 3 Stunden erneuert und die Dialysekassette über Nacht in diesem Puffer belassen. Am nächsten Tag wurde die entsalzte Viruslösung aus der Dialysekassette gewonnen und 1:1 mit dem Lagerungspuffer für Adenoviren (VIII.1) versetzt. Diese Virusstammlösung wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert (Graham & Prevec, 1995).

II.2.4 TCID₅₀-Methode zur Virusquantifizierung

Der Titer der Virusstammlösungen wurde mit der TCID₅₀-Methode (*tissue culture infectious dose 50*) bestimmt (aus dem Handbuch zum „AdEasy Vectorsystem“ von Quantum Biotechnologies). Dazu wurden in 96-Well Flachboden-Mikrotiterplatten 5×10^4 HEK 293 Zellen in 100 µl DMEM mit 2% FCS (VIII.1) ausgesät und logarithmische Verdünnungen der Adenoviren in 100 µl DMEM mit 2% FCS zugegeben (Verdünnungen von 10^{-2} bis 10^{-30}). Pro Verdünnungsstufe wurden 10 Wells angesetzt. Als Kontrollen dienten Ansätze von 5×10^4 HEK 293 Zellen in 100 µl Medium, denen nur weitere 100 µl Medium ohne Viren zugegeben wurden. Nach 10 Tagen wurde der Test abgelesen und die Konzentration der adenoviralen Stocklösungen berechnet.

II.3 Molekularbiologische Methoden

II.3.1 Isolierung und Quantifizierung der Gesamt-RNA

Zur Gewinnung der gesamten RNA aus transduzierten DC wurden die Zellen abzentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Zur Isolierung der RNA wurde der RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers mit einem zusätzlichen DNA-Verdau (RNase-free DNase Set, Qiagen) für 30 Minuten durchgeführt. Nach der Isolierung wurden die RNA-Proben mit dem „RiboGreen™ RNA Quantification Kit“ (Molecular Probes) nach Angaben des Herstellers quantifiziert.

II.3.2 RT-PCR

II.3.2.1 Reverse Transkription der RNA

Nach der Quantifizierung (II.3.1) wurden je nach Menge des Ausgangsmaterials 100 bis 200 ng RNA für die reverse Transkription eingesetzt. Zur Synthese der cDNA wurde der „1st Strand cDNA Synthesis Kit“ (Roche Diagnostics) mit AMV (aus *avian myoblastosis virus*) als reverser Transkriptase verwendet. Für jede Probe wurden die folgenden Komponenten in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß (MicroAmp® Reaction Tubes, PE Applied Biosystems) auf Eis pipettiert:

Reagenzien	Menge	Endkonzentration
10x RT-Puffer (100 mM Tris, 500 mM KCl, pH 8,3)	2 µl	1x
25 mM MgCl ₂	4 µl	5 mM
10 mM dNTP	2 µl	1 mM
„Random Hexamers“ p(dN) ₆	2 µl	0,16 µg/µl
RNase Inhibitor (40 U/µl)	1 µl	2 U/µl
AMV reverse Transkriptase (10 U/µl)	0,8 µl	0,4 U/µl
RNA	X	100 – 200 ng
H ₂ O bidest.	ad 20 µl	

In einem Thermocycler (GeneAmp PCR System 9700, PE Applied Biosystems) wurde das folgende Programm zur cDNA-Synthese verwendet:

Temperatur	Dauer	
25°C	10 Minuten	→ Bindung der Oligonukleotide an die RNA
42°C	60 Minuten	→ Umschreiben der RNA in cDNA
68°C	15 Minuten	→ Inaktivierung der reversen Transkriptase

Die cDNA wurde direkt zur Amplifizierung eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

II.3.2.2 Amplifizierung des Maus-FasL

Die cDNA (II.3.2.1) wurde als Matrize für die Amplifizierung des Maus-FasL eingesetzt. In einem Reaktionsansatz von insgesamt 20 µl wurden die cDNA und 10 pmol des entsprechenden Primerpaares (Tab. 3) mit H₂O bidest. auf 10 µl aufgefüllt. Dazu wurde 10 µl des „Taq PCR Mastermix Kit“ (Qiagen) pipettiert.

Tab. 3: Primerpaare für die RT-PCR. Die Sequenzen wurden unter Verwendung des Programms DNasis 2.5 (Hitachi Software Engineering, Amersham Pharmacia) ermittelt und zeigten keine Bindungsaffinität an den humanen FasL (Überprüfung mit „BLAST Search“, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Name	Sequenz	Annealing T	Produktlänge
Vorwärts Maus FasL	5'-AGGAATGTATACGCTCTTCC-3'	57°C	369 Bp
Rückwärts Maus FasL	5'-CCTCATATAGACCTTGTGGT-3'		
Vorwärts human 18s	5'-TCAAGAACGAAAGTCGGAG-3'	50-60°C	488 Bp
Rückwärts human 18s	5'-GGACATCTAAGGGCATCACA-3'		

Die Amplifizierung des Maus FasL und der 18s rRNA erfolgte nach dem folgenden Programm in einem Thermocycler:

1 x	95°C	5 Minuten	Denaturierung
20 x	94°C	30 Sekunden	Denaturierung
	57°C	30 Sekunden	Primer-Bindung
	72°C	30 Sekunden	Elongation
1x	72°C	7 Minuten	Elongation

II.3.3 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde 1% Agarose (FCM Bioproducts) in 1x TAE-Puffer (VIII.1) erwärmt und nach Abkühlen mit GelStar[®] (BMA) zur Visualisierung der Proben versetzt. Nach der Aushärtung des Gels wurden die RT-PCR Proben aufgetragen. Als Größenstandard wurde die Ready-Load[™] 100 Bp DNA-Leiter (Invitrogen) verwendet. Die Elektrophoresedauer betrug 20 Minuten bei 100V in einer Elektrophoresekammer (Run One[™] Electrophoresis Cell; Embi Tec).

III Ergebnisse

III.1 Charakterisierung unreifer und reifer DC nach Differenzierung aus Monozyten

Ein eindeutiger, einzelner Marker für DC ist bis jetzt noch nicht bekannt. Vielmehr sind die verschiedenen DC-Populationen durch eine Kombination von Oberflächenantigenen und ihre Fähigkeit zur effizienten Stimulation von T-Lymphozyten charakterisiert. DC können aus verschiedenen Vorläuferzellen entstehen, die sich auch funktionell unterscheiden lassen. Da es zahlreiche verschiedene Protokolle zur Generierung von DC *in vitro* gibt (Ardavin *et al.*, 2001), wurden zunächst die in dieser Arbeit verwendeten DC phänotypisch charakterisiert.

Unmittelbar nach der Elutriation wurde ein Aliquot der Monozyten mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD83, CD86 (beide PE-konjugiert), CD86, HLA-DR (beide FITC-konjugiert) sowie den entsprechenden Isotypkontrollen gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Vom gleichen Spender wurden weitere Monozyten in dem kommerziell erhältlichen serumfreien CellGro[®] Medium unter Zugabe von IL-4 und GM-CSF (jeweils 500 U/ml) *in vitro* zu DC differenziert. Nach 7 Tagen wurde die Kultur geteilt und die Hälfte der unreifen DC mit den proinflammatorischen Molekülen IL-1 β , IL-6, TNF- α und PGE₂ gereift. An Tag 9 wurden die unreifen (iDC) und reifen DC (mDC) gewonnen und ebenfalls für eine durchflusszytometrische Analyse gefärbt. Die Phänotypisierung der verwendeten DC-Populationen wurde bei sechs verschiedenen DC-Spendern vor Beginn der Experimente wiederholt, um den Einsatz definierter DC-Populationen zu gewährleisten.

Die Expression des MHC-Klasse-II-Moleküls HLA-DR gilt als wichtiger Marker für APC. Die Präsentation eines Antigens über MHC-Klasse-II-Moleküle ist essentiell für die Initiierung einer Immunantwort durch Aktivierung von CD4⁺ T-Lymphozyten (T-Helferzellen). Wichtig für die vollständige Aktivierung von T-Zellen ist außerdem die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) (Sharpe & Freeman, 2002). **Abb. 6** zeigt Histogramme (aufgetragen sind Fluoreszenzintensität gegen Anzahl der Ereignisse) verschiedener Oberflächenantigene auf Monozyten sowie iDC und mDC. Monozyten zeigten keine CD80- und CD83-Expression, jedoch im Vergleich zu mDC geringere Mengen an CD86 und HLA-DR. Nach der Ausdifferenzierung der Monozyten zu iDC und mDC änderte sich der Phänotyp. Nach der Reifung der DC wurden sowohl das kostimulatorische Molekül CD80 als auch MHC-Klasse-II-Moleküle (HLA-DR) auf den Zellen verstärkt exprimiert. Ein wichtiger Reifungsmarker für DC ist CD83, welcher in

Übereinstimmung mit publizierten Studien auf iDC nicht nachgewiesen werden konnte (Kruse *et al.*, 2001; Lehner *et al.*, 2001). Auf reifen DC konnte CD83 dagegen detektiert werden.

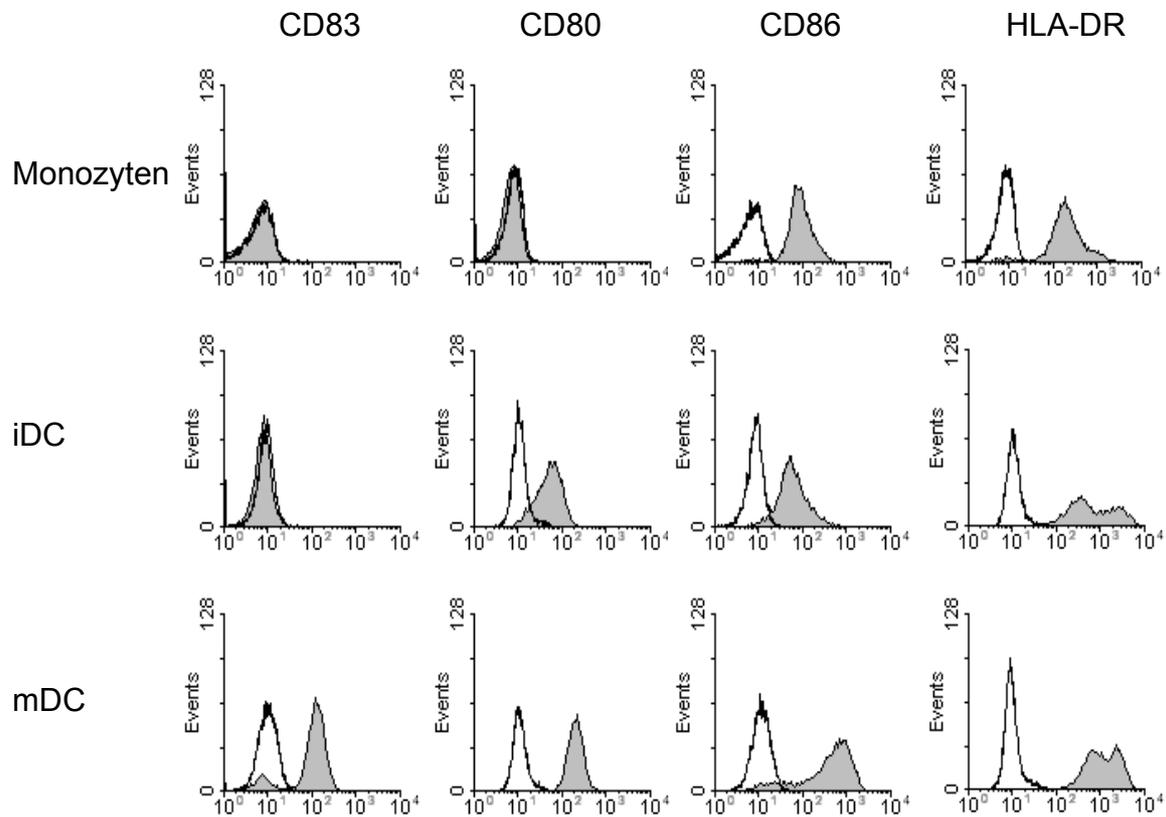


Abb. 6: Phänotyp von Monozyten sowie unreifen und reifen DC. Monozyten, unreife (iDC) und reife DC (mDC) wurden mit monoklonalen Antikörpern zur Detektion von Oberflächenantigenen gefärbt. Die offenen Profile präsentieren den jeweiligen Isotyp, die grauen unterlegten Profile das bezeichnete Oberflächenantigen.

III.2 Adenovirale Transduktion von humanen DC mit Maus-FasL

Durch die Verwendung des induzierbaren Cre/loxP-Vektorsystems war es möglich, große Mengen von FasL-kodierenden Adenoviren herzustellen, ohne dass die Vermehrungszelllinie HEK 293 durch die Induktion der Fas-vermittelten Apoptose vor der Produktion ausreichender Virustiter eliminiert wurde. Für eine erfolgreiche FasL-Expression war die gleichzeitige Transduktion einer Zelle durch die beiden Vektoren AxCANCre und AdloxPFasL erforderlich.

III.2.1 Nachweis von Maus-FasL mittels RT-PCR

Unreife und reife DC wurden entweder nicht, mit dem Kontrollvektor AdEGFP, oder mit AxCANCre und AdloxPFasL einfach oder in Kombination transduziert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen geerntet und die Gesamt-RNA aufgereinigt. In einer RT-PCR wurde dann die Expression des Maus-FasL in den Zellen bestimmt und zur Visualisierung auf ein Agarosegel aufgetragen. In **Abb. 7** ist eines von insgesamt acht Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen dargestellt.

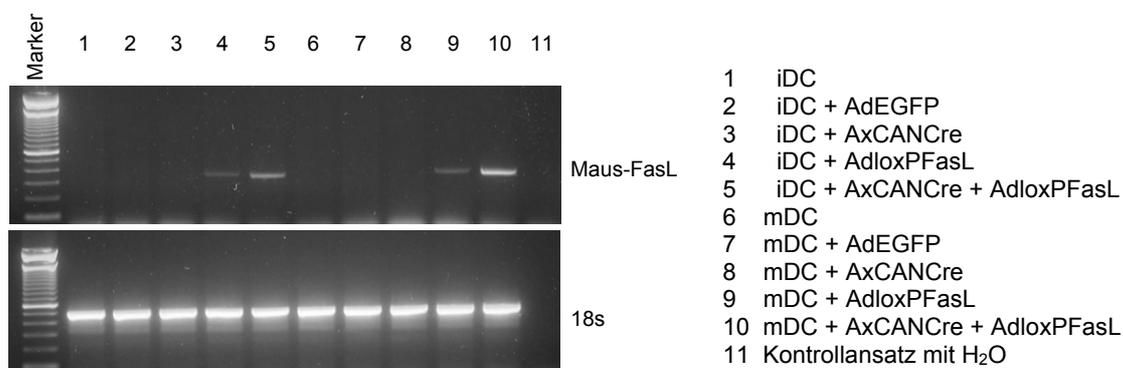


Abb. 7: RT-PCR für Maus-FasL nach Transduktion unreifer und reifer DC. An Tag 3 nach der Transduktion von iDC und mDC mit AdEGFP oder AxCANCre und AdloxPFasL einfach oder in Kombination wurde die Gesamt-RNA isoliert und in einer RT-PCR eingesetzt. Die Produkte der RT-PCR für den Maus-FasL waren 368 Bp und die des Haushaltsgens 18s rRNA 488 Bp lang (Größenstandard 100 Bp DNA-Leitern).

Sowohl bei iDC als auch mDC konnte eine starke Expression des Maus-FasL nur nach der Doppeltransduktion mit AxCANCre und AdloxPFasL festgestellt werden (Spur 5: iDC; Spur 10: mDC). Nicht transduzierte DC wiesen keine Expression des Maus-FasL auf (Spur 1: iDC; Spur 6: mDC), ebenso wenig die mit dem Kontrollvektor AdEGFP (Spur 2: iDC; Spur 7:

mDC) und die mit AxCANCre (Spur 3: iDC; Spur 8: mDC) transduzierten DC. Eine schwache Bande erschien nach Einfachtransduktion mit AdloxPFasL bei iDC (Spur 4) und mDC (Spur 9). Diese Bande wurde schon bei der Generierung des Vektors beschrieben und scheint auf eine geringe spontane Transkription des FasL-Gens zurückzuführen zu sein (Zhang *et al.*, 1998).

III.2.2 Nachweis des Maus-FasL auf der Oberfläche humaner DC mit Durchflusszytometrie

Die iDC und mDC wurden mit AxCANCre und AdloxPFasL einfach oder gleichzeitig mit beiden Vektoren transduziert, als Kontrollzellen dienten unbehandelte DC. Drei Tage nach der Transduktion wurde die Expression des Maus-FasL auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch bestimmt. **Abb. 8** bis **Abb. 10** zeigen je ein repräsentatives von insgesamt fünf durchgeführten Experimenten.

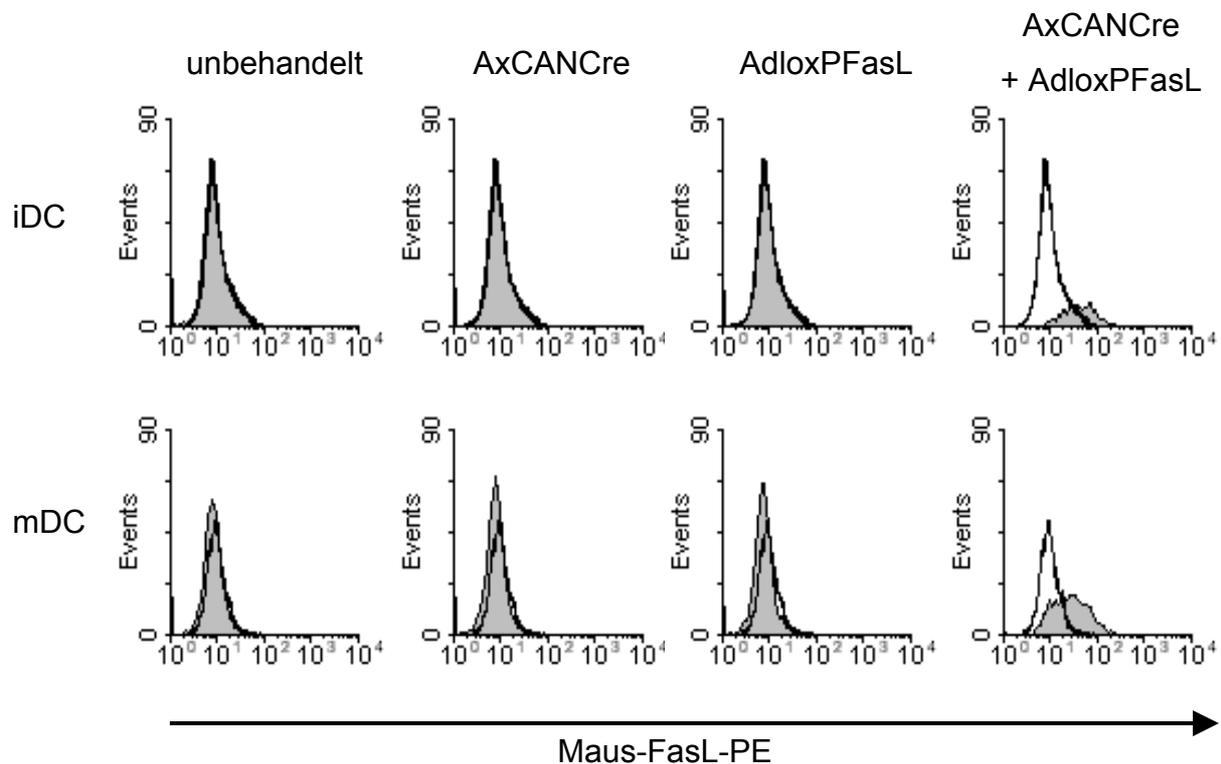


Abb. 8: Expression des Maus-FasL nach Transduktion von iDC und mDC. Unreife und reife DC wurden mit AxCANCre und AdloxPFasL einfach oder in Kombination transduziert. Als Kontrollzellen dienten unbehandelte iDC und mDC. Am Tag 3 nach der Transduktion wurden die Expression des Maus-FasL auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Histogramme der Maus-FasL Expression nach Färbung mit dem PE-konjugierten Antikörperklon Kay-10 (grau unterlegte Profile) oder der Isotypkontrolle (offene Profile).

Nur nach Doppeltransduktion mit AxCANCre und AdloxPFasL konnte eine Expression des Maus-FasL bei iDC und mDC festgestellt werden (**Abb. 8**). Unbehandelte oder einfach transduzierte DC zeigten keine Expression des Maus-FasL. Die doppeltransduzierten iDC wiesen dabei eine deutlich schwächere Expression (Maus-FasL⁺ < 20%) auf als die entsprechenden mDC (Maus-FasL⁺ ~80%).

Außerdem wurde die endogene Fas- und FasL-Expression von iDC und mDC vor der Transduktion im Durchflusszytometer bestimmt (**Abb. 9**). Die Analyse der Oberflächenmarker vor der Transduktion ergab, dass beide Zellpopulationen eine allenfalls schwache Expression des humanen FasL aufwiesen. Sowohl iDC als auch mDC waren dagegen stark Fas⁺ (**Abb. 9**).

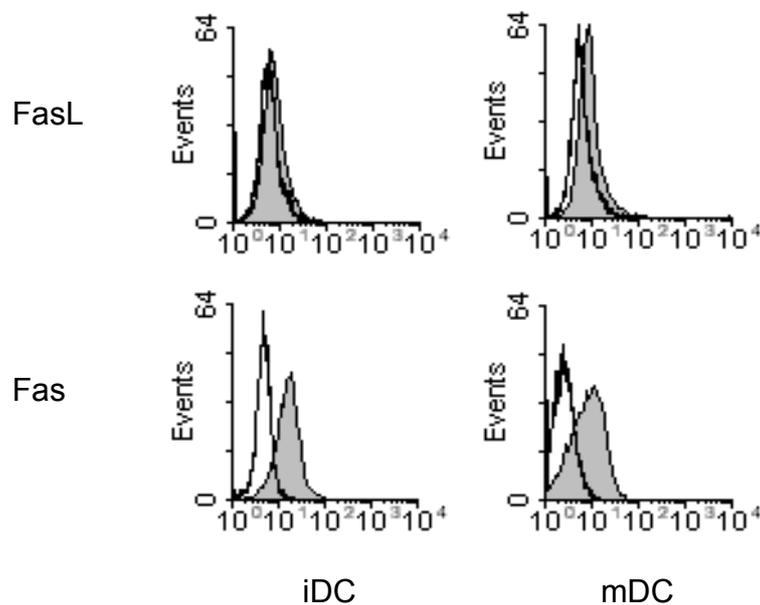


Abb. 9: Expression von humanem Fas und FasL. Unreife DC und reife DC (Tag 7 der Differenzierung) wurden mit PE-markierten Antikörpern zur Detektion von humanen Fas und FasL gefärbt. Dargestellt sind Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse (offene Profile: Isotyp; graue Profile: humaner FasL bzw. Fas).

Somit bestand die Möglichkeit der „Selbstelimination“ nach erfolgreicher Transduktion mit dem FasL-Gen, weshalb im Weiteren die Apoptoseraten von FasL-transduzierten und nicht transduzierten DC untersucht wurden. Die Färbung mit Annexin V-FITC/PI an Tag 3 nach der Transduktion ergab, dass nur die mit AdloxPFasL plus AxCANCre behandelten iDC abstarben (**Abb. 10**). Nicht transduzierte Kontrollen und mit AdloxPFasL oder AxCANCre einfach transduzierte DC zeigten keinen Unterschied in der Anzahl lebender Zellen (Annexin V⁻/PI⁻, linker unterer Quadrant), früh apoptotischer Zellen (Annexin V⁺/PI⁻, rechter unterer Quadrant) oder spät apoptotischer bzw. sekundär nekrotischer Zellen

(Annexin V⁺/PI⁺, rechter oberer Quadrant). Dabei konnte bei den vor der Transduktion gereiften DC eine leicht erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu den iDC festgestellt werden. Nach Doppeltransduktion der iDC mit AdloxPFasL und AxCANCre belief sich der Anteil lebender Zellen nur noch auf 6% der Gesamtpopulation. Die Doppeltransduktion ausgereifter DC führte hingegen nur zu einer leichten Erhöhung der Apoptoserate im Vergleich zu den nicht oder nur einfach transduzierten Kontroll-mDC.

Die in der RT-PCR festgestellten geringen Mengen an mRNA des Maus-FasL konnten nach Einzeltransduktion mit dem Vektor AdloxPFasL in der durchflusszytometrischen Analyse nicht detektiert werden. Es wurde auch keine gesteigerte Apoptose bei den AdloxPFasL-transduzierten iDC beobachtet.

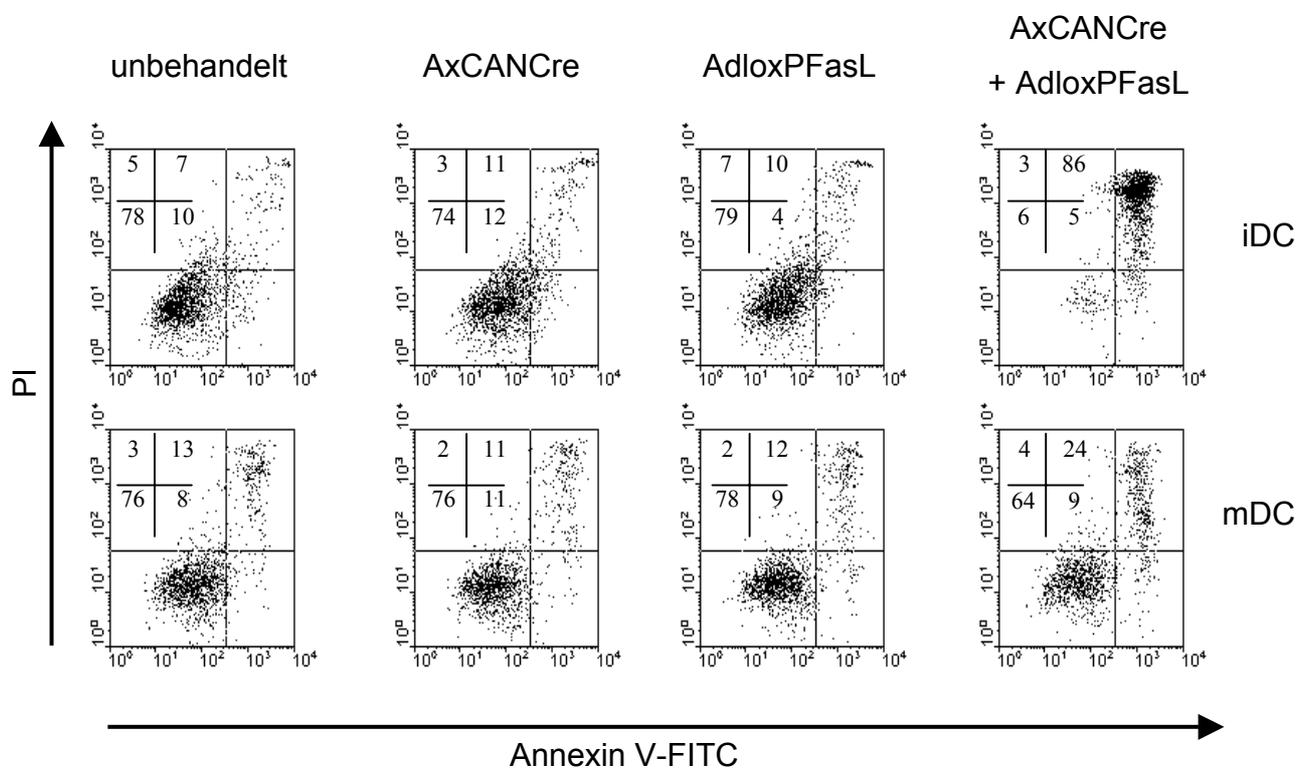


Abb. 10: Apoptoseinduktion nach Transduktion von iDC und mDC mit Maus-FasL. Unreife und reife DC wurden mit AxCANCre und AdloxPFasL einfach oder mit beiden Vektoren transduziert. Als Kontroll-DC wurden unbehandelte iDC und mDC eingesetzt. Drei Tage nach der Transduktion wurde eine Apoptosefärbung mit Annexin V-FITC/PI durchgeführt. Dargestellt sind Dotplots der Zweifarbenanalysen.

Diese Ergebnisse zeigten, dass reife DC im Gegensatz zu unreifen DC nach Transduktion mit dem FasL-Gen vor Fas-vermittelter Apoptose geschützt waren, was auf Grund der detektierten Fas-Expression auf eine Regulationsmechanismus unterhalb der Rezeptorebene hinwies.

III.2.2.1 *Kinetik der FasL-Expression und Apoptoseinduktion nach Transduktion von iDC und mDC*

Reife und unreife DC wurden mit verschiedenen MOI der Vektoren AxCANCre und AdloxPFasL gleichzeitig transduziert und die Expression des Maus-FasL an den Tagen 1, 2 und 3 untersucht. Parallel dazu wurde der Anteil apoptotischer Zellen mit einer Annexin V-FITC/PI-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Für jedes der beiden Viruskonstrukte wurde eine MOI von 200, 100, 50 und 25 eingesetzt. Als Kontroll-DC dienten nicht transduzierte iDC bzw. mDC. In **Abb. 11** sind die Ergebnisse eines repräsentativen von insgesamt drei vergleichbaren Experimenten dargestellt.

In Abhängigkeit von der verwendeten MOI konnten bei den iDC bereits am ersten Tag nach der Transduktion deutlich erhöhte Apoptoseraten im Vergleich zu den reifen DC festgestellt werden. Zu diesem Zeitpunkt konnte bei den transduzierten iDC jedoch keine Expression des Maus-FasL detektiert werden. Auch an Tag 2 und 3 nach der Transduktion wurde nur bei einer MOI von 200 für jeden Vektor eine FasL-Expression auf iDC beobachtet. Jedoch waren zu diesem Zeitpunkt nahezu alle Zellen in der Kultur apoptotisch. Ein deutlich anderes Bild zeigte sich nach Transduktion reifer DC. Während bei keiner der verschiedenen MOI an den 3 Messtagen nennenswert Apoptose nachgewiesen werden konnte, zeigte sich jedoch eine stark von der MOI abhängige Expression des Maus-FasL. Mit steigender MOI erhöhte sich auch der prozentuale Anteil an Maus-FasL⁺ Zellen (85% FasL⁺ mDC bei einer MOI von 200 für jeden Vektor).

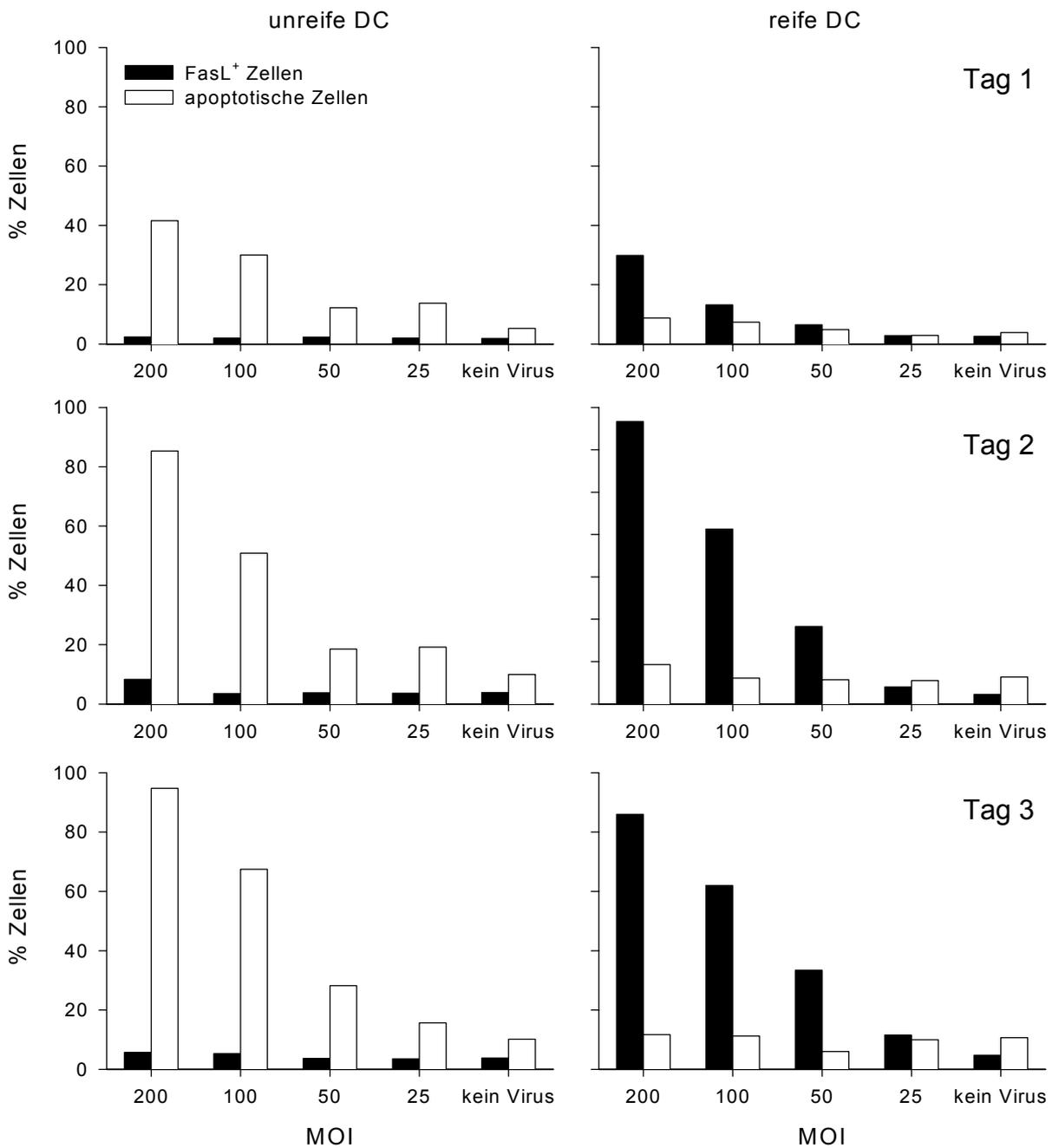


Abb. 11: Kinetik der FasL-Expression und Apoptoseraten nach Transduktion von iDC und mDC. Unreife und reife DC wurden mit verschiedenen MOI der Vektorkonstrukte AxCANCre und AdloxPFasL transduziert. An Tag 1, 2 und 3 nach der Transduktion wurde die Expression des Maus-FasL bestimmt und eine Färbung mit Annexin V-FITC/PI durchgeführt. Weiße Balken: prozentualer Anteil der Annexin V⁺/PI⁻ plus Annexin V⁺/PI⁺ Zellen der Gesamtpopulation, schwarze Balken: prozentualer Anteil Maus-FasL⁺ Zellen der Gesamtpopulation.

III.2.2.2 Löslicher Maus-FasL

FasL kann in drei verschiedenen Formen vorliegen: als membrangebundenes Molekül, als prozessierte lösliche Form (sFasL; Suda *et al.*, 1997) sowie als sFasL in intrazellulären Mikrovessikeln (Martinez-Lorenzo *et al.*, 1998; Bossi & Griffiths, 1999). Die lösliche Form des FasL entsteht durch Prozessierung von FasL auf der Zelloberfläche durch zell- bzw. gewebsspezifische Metalloproteinasen (Kayagaki *et al.*, 1995) und ist potenziell an der Modulation der Fas-vermittelten Apoptose beteiligt. In den vorliegenden Untersuchungen wurde der Maus-FasL bei humanen Zellen eingesetzt. Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob auch nach Transduktion humaner DC der Maus-FasL prozessiert wird und als sFasL in den Kulturen vorliegt.

Unreife und reife DC wurden mit AxCANCre und AdloxPFasL einfach oder in Kombination transduziert. Als Kontroll-DC dienten unbehandelte oder mit AdEGFP transduzierte iDC und mDC. Nach der Transduktion wurden die DC auf $0,5 \times 10^6$ DC/ml resuspendiert, die Überstände 3 Tag später abgenommen und mit einem spezifischen ELISA der Maus-sFasL quantifiziert.

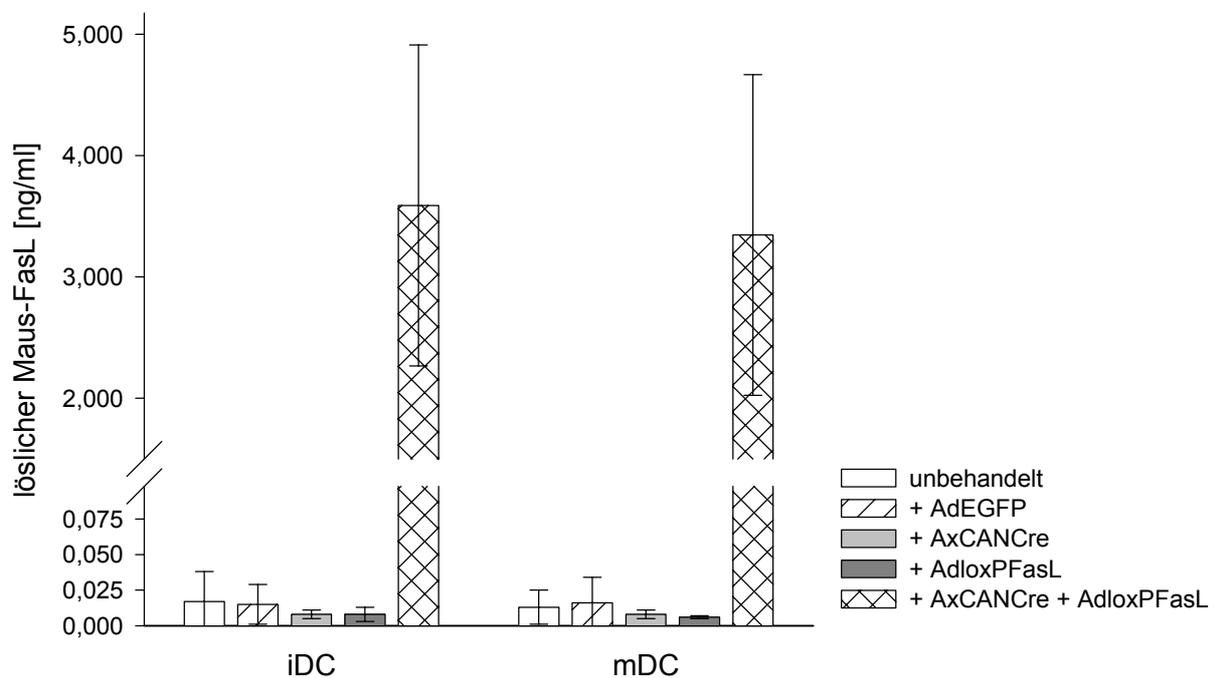


Abb. 12: Löslicher Maus-FasL in Kulturen transduzierter humaner DC. Die iDC und mDC wurden entweder nicht, mit dem Kontrollvektor AdEGFP oder den Vektoren AxCANCre und AdloxPFasL einfach oder in Kombination transduziert. Anschließend wurden die DC auf eine Konzentration von $0,5 \times 10^6$ DC/ml eingestellt. An Tag drei nach der Transduktion wurden die Überstände der Kulturen abgenommen mit einem ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Konzentrationen \pm SD von 6 Experimenten.

Bei nicht transduzierten iDC und mDC sowie nach Transduktionen mit dem Kontrollvektor AdEGFP oder den Vektoren AxCANCre und AdloxPFasL alleine konnte der lösliche Maus-FasL nicht im Zellüberstand nachgewiesen werden (**Abb. 12**). Nur nach Doppeltransduktion von iDC und mDC mit AxCANCre bzw. AdloxPFasL konnten in den Kulturen große Mengen (3-4 ng/ml) an Maus-sFasL detektiert werden. Da in den Kulturen nach der Transduktion kein Mediumwechsel vorgenommen wurde, konnte sFasL im Überstand akkumulieren.

III.2.3 Phänotyp und Funktionalität transduzierter DC

Der Einfluss einer adenoviralen Transduktion auf die Expression von Reifungsmarkern bei humanen DC wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen mit widersprüchlichen Ergebnissen untersucht. In einigen Fällen wurden Adenoviren als reifungsinduzierend für humane DC beschrieben (Sonderbye *et al.*, 1998; Rea *et al.*, 1999; Rouard *et al.*, 2000; Lundqvist *et al.*, 2002a), von anderen Arbeitsgruppen jedoch nicht (Diao *et al.*, 1999; Jonuleit *et al.*, 2000b).

III.2.3.1 Phänotyp EGFP-transduzierter iDC und mDC

Um den Einfluss der adenoviralen Transduktion auf iDC und mDC zu untersuchen, wurden diese mit AdEGFP transduziert und der Phänotyp vier Tage später im Durchflusszytometer analysiert. Das fluoreszierende Molekül EGFP konnte simultan mit den PE-markierten Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD83, CD80, CD86 und HLA-DR in einer Zweifarbenanalyse im Durchflusszytometer detektiert werden. Die Daten wurden als Dotplot aufgetragen. Dargestellt ist eines von drei vergleichbaren Experimenten.

Abb. 13 A zeigt, dass die Transduktion der iDC keine Reifung dieser Zellen zur Folge hatte. Die EGFP-transduzierten iDC wiesen ebenso wie die unbehandelten iDC keine Expression von CD83, nur geringe Mengen der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 und eine relative niedrige Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen (HLA-DR) auf. Wurden die Zellen des gleichen Spenders vor der Transduktion mit den proinflammatorischen Molekülen IL-1 β , IL-6, TNF- α und PGE₂ ausgereift, zeigten sie den normalen, reifen Phänotyp mit Expression von CD83, sowie einer verstärkten Expression von kostimulatorischen Moleküle und von MHC-Klasse-II-Molekülen (**Abb. 13 B**, vergleiche **Abb. 6**). Die adenovirale Transduktion bzw. die Expression von EGFP hatte bei den EGFP-transduzierten mDC (mDC-EGFP) keinen Einfluss auf den Phänotyp, der dem unbehandelten reifen Kontroll-DC entsprach.

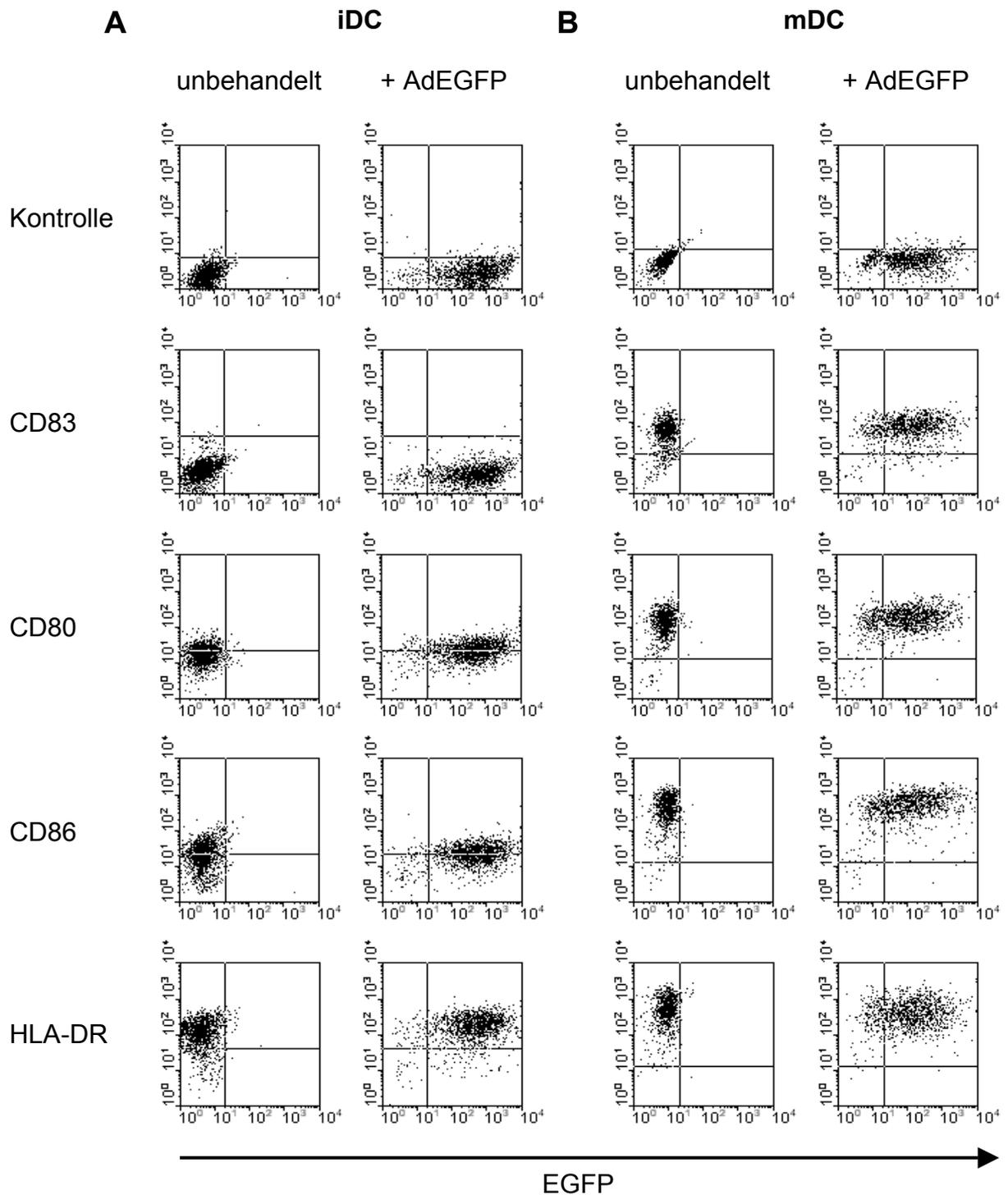


Abb. 13: Phänotyp EGFP-transduzierter iDC und mDC. Der Phänotyp EGFP transduzierter iDC (A) sowie mDC (B) wurde im Durchflusszytometer bestimmt, als Kontrollzellen dienten nicht transduzierte DC. Die Färbung der Oberflächenantigene erfolgte mit PE-markierten monoklonalen Antikörpern und wurde an Tag 3 nach der Transduktion durchgeführt. Dargestellt sind Dotplots der Zweifarbenanalysen.

III.2.3.2 Funktionelle Analyse der EGFP-transduzierten iDC und mDC

Neben der Expression von Oberflächenmarkern ist auch eine Beurteilung der Funktionalität von DC ein wichtiger Indikator für ihren Reifungszustand. Unreife DC sind aufgrund fehlender oder nur schwach exprimierter kostimulatorischer und MHC-Klasse-II-Moleküle nicht in der Lage, naive T-Lymphozyten optimal zur Proliferation zu stimulieren (vergleiche **Abb. 6** und **Abb. 13 A**). Daher wurden verschiedene Mengen von iDC und mDC mit AdEGFP transduziert und 3 Tage später in einer MLR mit T-Lymphozyten eines allogenen Spenders eingesetzt. Zur Kontrolle wurden die T-Lymphozyten mit nicht transduzierten iDC und mDC des gleichen Spenders kokultiviert. In **Abb. 14** ist eines von drei vergleichbaren Experimenten dargestellt.

Die Expression von EGFP in iDC hatte keinen Einfluss auf die Stimulationsfähigkeit dieser Zellen. Sowohl iDC als auch iDC-EGFP konnten die allogenen T-Zellen deutlich schlechter stimulieren als die vor der Transduktion gereiften mDC. Auch die adenovirale Transduktion beeinträchtigte die Stimulationsfähigkeit der mDC-EGFP nicht. Die Proliferationsraten der T-Lymphozyten nach Stimulation mit mDC-EGFP waren vergleichbar mit denen in den Kokulturen mit nicht transduzierten mDC.

Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass weder der Phänotyp noch die Funktionalität der iDC und mDC durch die verwendete Vektorkontrolle verändert wurden.

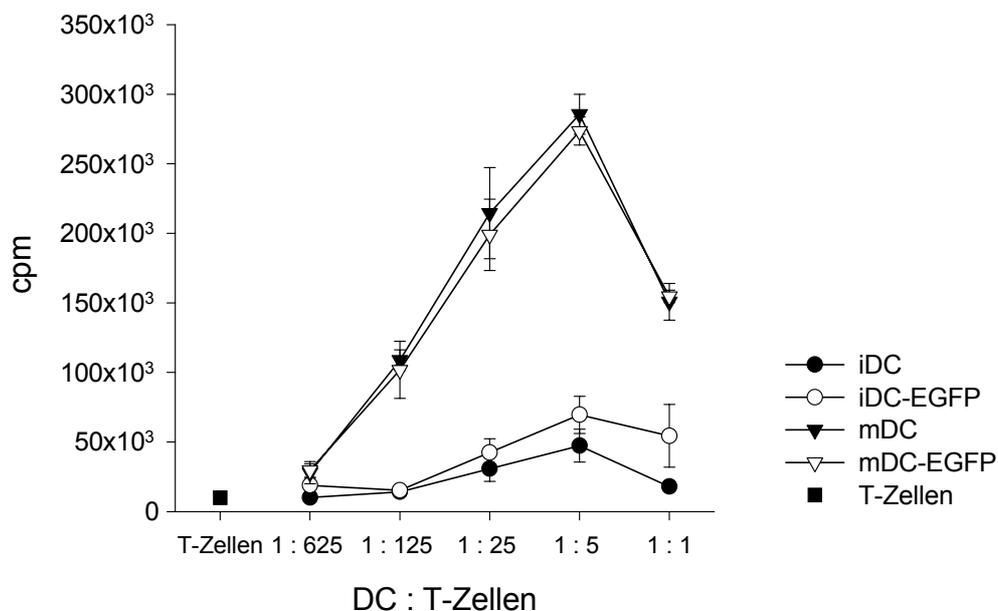


Abb. 14: Allogene MLR mit EGFP-transduzierten iDC und mDC. EGFP-transduzierte iDC und mDC wurden mit allogenen T-Lymphozyten für 5 Tage und dann für weitere 20 Stunden mit ³H-Methyl-Thymidin inkubiert. Zur Kontrolle wurden Kokulturen angesetzt, bei denen nicht transduzierte iDC und mDC als Stimulatoren verwendet wurden. Dargestellt sind Mittelwerte der cpm ± SD eines dreifach Ansatzes.

III.2.3.3 Phänotyp *FasL*-transduzierter reifer DC

In den vorherigen Abschnitten wurde beschrieben, dass unreife DC durch die Transduktion mit *FasL* durch Induktion der *Fas*-vermittelten Apoptose abstarben (III.2.2). In Versuchen mit primären humanen T-Lymphozyten wurden daher die vor der Transduktion gereiften DC (im Weiteren als mDC-*FasL* bezeichnet) eingesetzt, da nur diese Zellen vor der *Fas*-vermittelten Apoptose geschützt waren. Zur phänotypischen Charakterisierung der mDC-*FasL* wurden mDC mit AxCANCre plus AdloxPFasL transduziert. Als Kontroll-DC wurden nicht transduzierte mDC eingesetzt. An Tag 4 nach der Transduktion wurden diese DC für eine Zweifarbenanalyse im Durchflusszytometer gefärbt. Zur Detektion des Maus-*FasL* wurde der PE-markierte Antikörperklon Kay-10 eingesetzt. Die Oberflächenmarker CD83, CD80, CD86 und HLA-DR wurden mit FITC-markierten Antikörpern gefärbt. Dargestellt ist eines von drei vergleichbaren Experimenten.

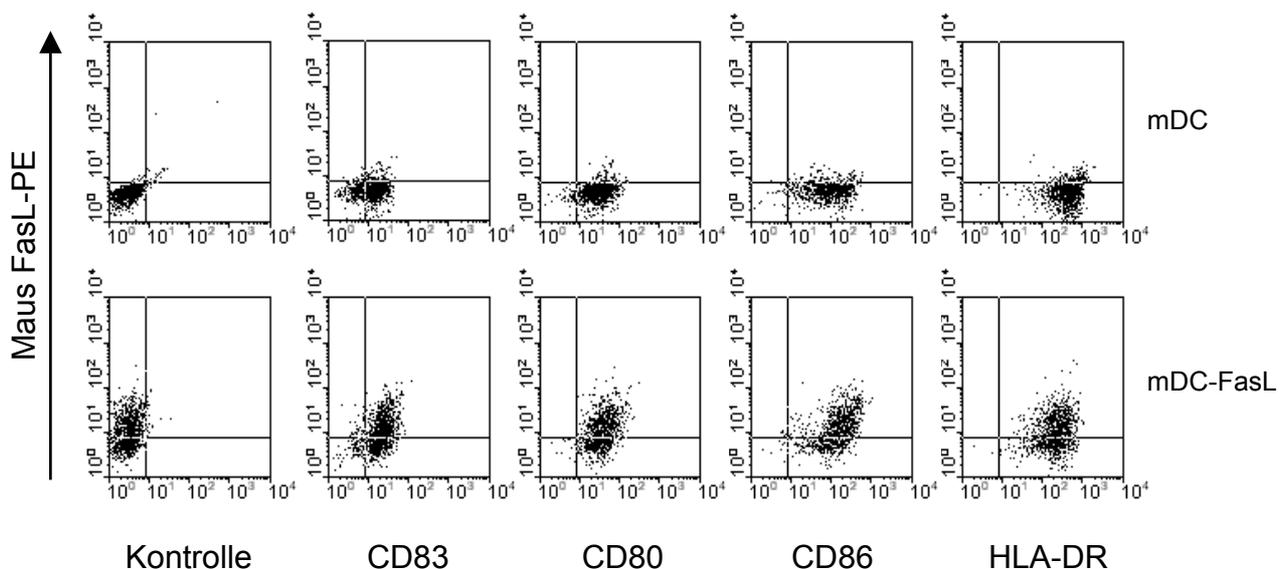


Abb. 15: Phänotyp der mDC-*FasL*. Reife DC wurden an Tag 4 nach Transduktion mit AxCANCre und AdloxPFasL (mDC-*FasL*) für die Analyse im Durchflusszytometer gefärbt. Als Kontrollzellen dienen untransduzierte mDC des gleichen Spenders. Alle Zellen wurden mit dem PE-markierten anti-Maus-*FasL*-Antikörper gefärbt. Der Nachweis der anderen Oberflächenantigene erfolgte mit FITC-markierten monoklonalen Antikörpern. Dargestellt sind Dotplots der Zweifarbenanalysen.

Der Vergleich der relevanten Oberflächenmarker auf mDC-*FasL* erbrachte keinen Unterschied zu reifen, unbehandelten DC (mDC in **Abb. 15**). Bei mDC-*FasL* konnte eine etwas stärkere Expression des Oberflächenmarkers CD86 als auf den Kontroll-mDC festgestellt werden. Die simultane Transduktion mit den beiden Vektoren AxCANCre plus AdloxPFasL hatte in keinem Fall einen Verlust der untersuchten Oberflächenmarker zur Folge. Trotz adenoviraler Transduktion und Expression eines zytotoxischen Genprodukts

wurde die Expression der zur T-Zellaktivierung notwendigen Moleküle insgesamt nicht beeinträchtigt.

Die Funktionalität der FasL-transduzierten DC ist Gegenstand der folgenden Abschnitte und wird dort ausführlich dargestellt.

III.2.3.4 Expression von Maus-FasL und humanem FasL auf transduzierten mDC

Zur Klärung der Frage, ob nur mDC-FasL das apoptoseinduzierende Molekül auf ihrer Oberfläche tragen, wurden mDC, mDC-EGFP und mDC-FasL auf die Expression des Maus- sowie des endogenen humanen FasL an Tag 3 nach der Transduktion durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist eines von zwei vergleichbaren Experimenten (**Abb. 16**).

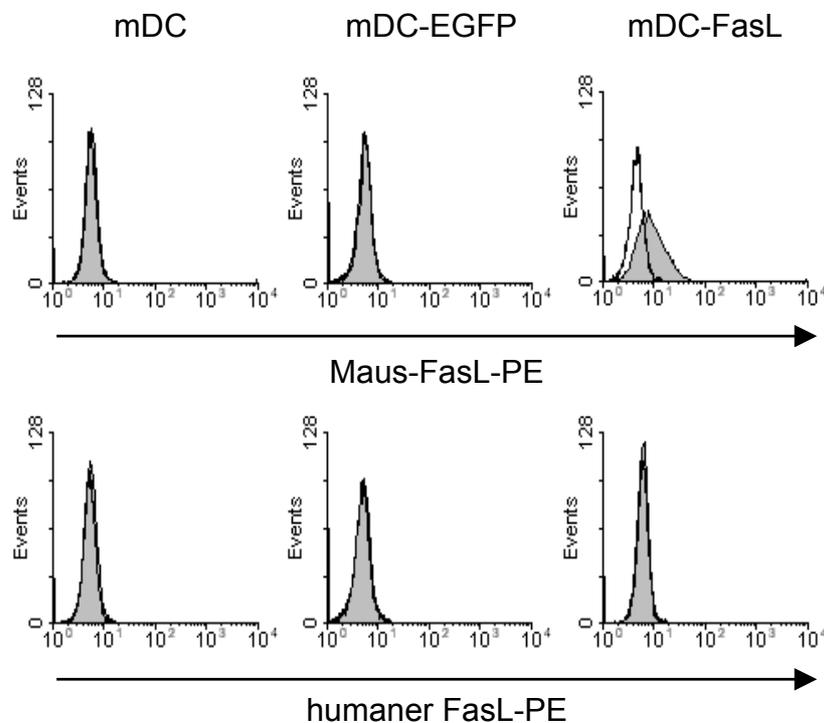


Abb. 16: Expression von Maus-FasL und humanem FasL. Reife DC wurden mit AxCANCre und AdloxPFasL transduziert. Als Kontrollen wurden nicht oder EGFP-transduzierte mDC eingesetzt. An Tag 3 nach der Transduktion wurden die Zellen für eine Analyse im Durchflusszytometer gefärbt. Dargestellt sind Histogramme mit Isotypkontrollen (offene Profile) und spezifischen Antikörpern gegen den Maus- oder den humanen FasL (graue unterlegte Profile).

Mittels der durchflusszytometrischen Analyse konnte der Maus-FasL nur auf mDC-FasL detektiert werden (52% Maus-FasL⁺), nicht jedoch auf mDC oder mDC-EGFP. Die Färbung mit dem Antikörper gegen den humanen FasL erbrachte weder bei mDC, mDC-EGFP noch mDC-FasL ein positives Ergebnis.

III.3 Funktionalität FasL-transduzierter DC

III.3.1 Induktion von Apoptose bei Jurkat T-Zellen

Für eine erste funktionelle Analyse der FasL-transduzierten DC wurden zunächst Experimente mit Jurkat T-Zellen durchgeführt. Jurkat T-Zellen wurden aus einem humanen T-Zelllymphom isoliert und sind sehr sensitiv für Fas-vermittelte Apoptose (Weis *et al.*, 1995; Su *et al.*, 1998). In vielen Arbeiten zu FasL-exprimierenden APC wurde diese Zelllinie zur Überprüfung der Funktionalität *in vitro* eingesetzt (Matsue *et al.*, 1999; Min *et al.*, 2000; Matsue *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002b; Whartenby *et al.*, 2002).

III.3.1.1 JAM-Test zum Nachweis von Apoptose

Zur Bestimmung der Zytotoxizität der FasL-transduzierten DC wurde der JAM-Test (Übersicht in **Abb. 4**) durchgeführt. Jurkat T-Zellen wurden mit ³H-Methyl-Thymidin markiert, in einem Effektor-Target-Verhältnis von 1:4 für 5 Stunden mit DC kokultiviert und dann der Prozentsatz apoptotischer Zellen relativ zur unbehandelten Kontrollkultur (nur Jurkat T-Zellen) berechnet. Die iDC und mDC wurden einfach oder in Kombination mit AxCANCre und AdloxPFasL transduziert. Als Kontrollen dienten Kokulturen mit iDC oder mDC, die entweder nicht oder mit dem Kontrollvektor AdEGFP transduziert wurden. Als Positivkontrolle für die Apoptoseinduktion wurde ein agonistischer anti-Fas-Antikörper (CH11, Endkonzentration 1µg/ml) eingesetzt. Zur Untersuchung des Einflusses von sFasL bzw. des Zellkontaktes bei der Induktion des Zelltods wurden die gleichen Experimente auch im Transwellssystem durchgeführt. Dargestellt ist ein repräsentatives von insgesamt fünf Experimenten.

Bei 64% der Jurkat T-Zellen konnte durch den Zusatz des agonistischen anti-Fas-Antikörpers CH11 Apoptose induziert werden (**Abb. 17**). Wurden DC als Effektoren eingesetzt, konnte nur in den Kokulturen mit doppeltransduzierten DC (AxCANCre plus AdloxPFasL) Apoptose in den Targetzellen detektiert werden. Dabei wurde eine deutlich niedrigere Apoptoserate in Kokulturen von FasL-exprimierenden iDC (7%) im Vergleich zu den entsprechenden Kokulturen mit mDC (58%) gemessen. Die niedrige Apoptoseinduktion durch FasL-transduzierte iDC ist wohl auf deren eigenes Absterben und die daraus resultierende niedrige FasL-Expression zurückzuführen (vgl. **Abb. 8** und **Abb. 10**). Wurden iDC oder mDC nur mit einem der beiden Vektoren alleine transduziert, konnte keine Apoptose der Targetzellen detektiert werden. Auch durch den Einsatz von nicht oder EGFP-transduzierten DC wurde keine Apoptose induziert.

Neben der durchflusszytometrischen Analyse der Expression des Maus-FasL (III.2.2) bestätigte nun auch der JAM-Test, dass nur nach Doppeltransduktion mit AxCANCre plus AdloxPFasL funktionell aktiver FasL exprimiert wurde.

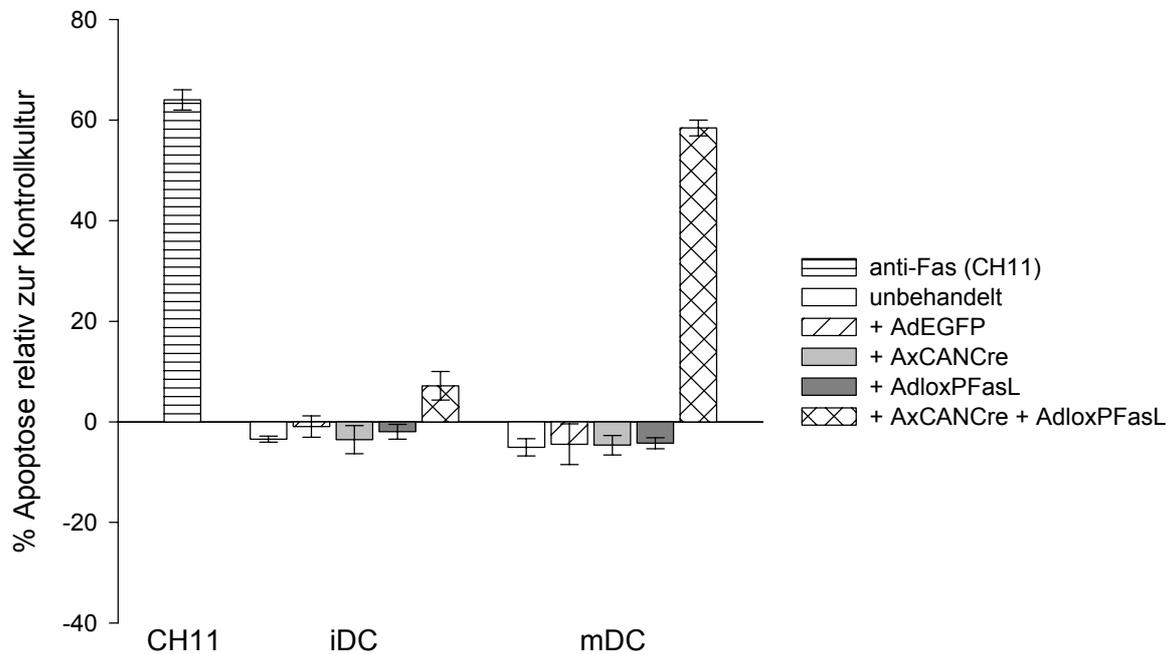


Abb. 17: JAM-Test. FasL-exprimierende iDC oder mDC sowie die entsprechenden Kontroll-DC wurden mit ^3H -Methyl-Thymidin markierten Jurkat T-Zellen im Verhältnis von 1:4 für 5 Stunden kokultiviert. Als Positivkontrolle wurde der agonistische anti-Fas-Antikörper CH11 ($1\mu\text{g/ml}$) eingesetzt. Dargestellt sind Mediane und die 25-75% Percentile der Apoptose relativ zur unbehandelten Kontrollkultur.

Um den Einfluss des Zellkontaktes sowie des sFasL bei der Apoptoseinduktion zu untersuchen, wurden Versuche mit getrennten Target- und Effektorzellen im Transwellsystem durchgeführt (**Abb. 18**). Nur in der Positivkontrolle, bei der zu den markierten Jurkat T-Zellen im unteren Kompartiment ein agonistischer anti-Fas-Antikörper in das obere Kompartiment zugegeben wurde, konnte bei 35% der Targetzellen Apoptose induziert werden. Weder bei iDC oder mDC nach Doppeltransduktion mit AxCANCre plus AdloxPFasL, noch bei den Kulturen mit den Kontroll-DC wurden erhöhte Apoptoseraten detektiert. Zur Induktion von Apoptose mit FasL-exprimierenden DC ist demnach Zellkontakt zwischen den Effektor- und den Targetzellen notwendig. Ein löslicher Faktor (hier der anti-Fas-Antikörper) kann die Membran überwinden und Apoptose induzieren. Der sFasL schien also bei der Apoptoseinduktion in diesem System keine Rolle zu spielen.

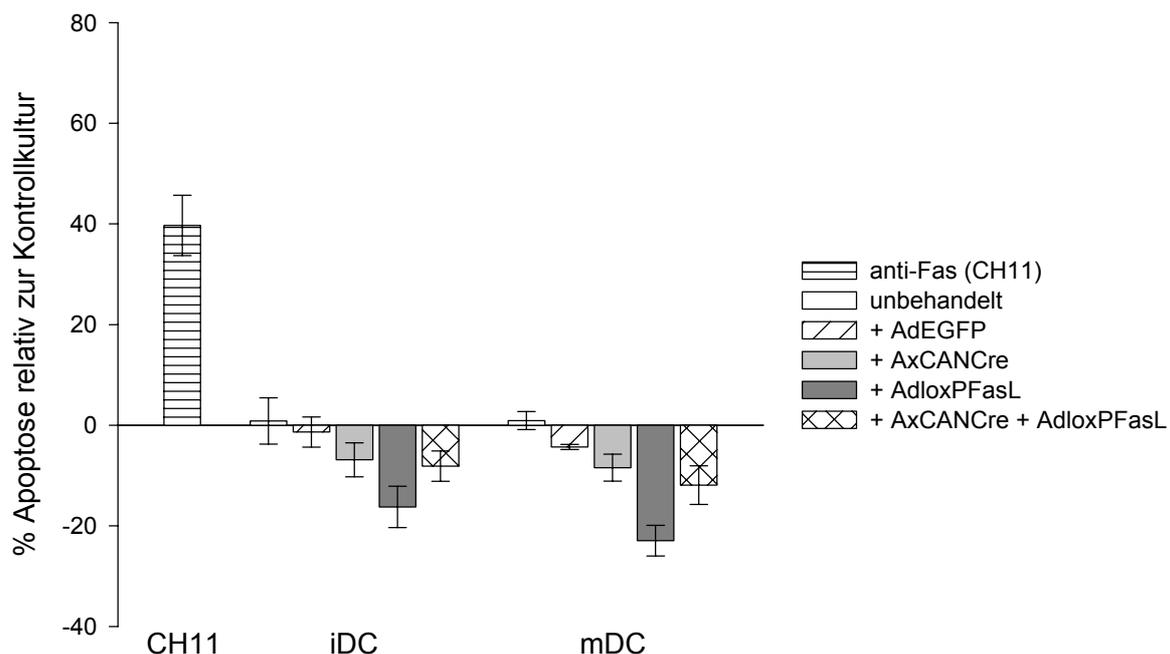


Abb. 18: JAM-Test im Transwellssystem. FasL-exprimierende iDC oder mDC sowie die entsprechenden Kontroll-DC wurden mit ^3H -Methyl-Thymidin markierten Jurkat T-Zellen durch eine Transwellmembran voneinander getrennt im Verhältnis von 1:4 für 5 Stunden inkubiert. Als Positivkontrolle wurde der agonistische anti-Fas-Antikörper CH11 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in den Transwelleinsatz gegeben. Dargestellt sind Mediane und die 25-75% Percentile der Apoptose relativ zur unbehandelten Kontrollkultur.

Die Homologie zwischen Maus-FasL und humanem FasL beträgt 76,9 %, und beide Moleküle wurden als funktionell untereinander austauschbar beschrieben (Nagata & Golstein, 1995). Die Ergebnisse des JAM-Tests sowie das Absterben der humanen FasL-transduzierten iDC (III.2.2) demonstrierten ebenfalls, dass ein spezieübergreifender Einsatz des Maus-FasL zur Apoptoseinduktion in einer humanen Zelllinie möglich war. Dabei war Zell-Zell-Kontakt für das Auslösen der Apoptose in den Targetzellen notwendig.

III.3.1.1.1 *Dosisabhängigkeit der Apoptoseinduktion durch mDC-FasL*

Auf Grund der geringen Fähigkeit der iDC, Apoptose zu induzieren (III.3.1.1) und des Absterbens nach Expression von FasL (III.2.2), wurden FasL-exprimierende iDC nicht in den weiteren funktionellen Untersuchungen eingesetzt. Es wurden hierfür ausschließlich mDC mit AxCANCre plus AdloxPFasL transduziert und zur weiteren Untersuchung der Dosisabhängigkeit von FasL-vermittelter Apoptose als Effektorzellen verwendet. Dazu wurden zuerst verschiedene Mengen der mDC-FasL mit ^3H -Methyl-Thymidin markierten Jurkat T-Zellen (5×10^4) als Targetzellen für 5 Stunden in einem JAM-Test koinkubiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von drei Wiederholungen (**Abb. 19**).

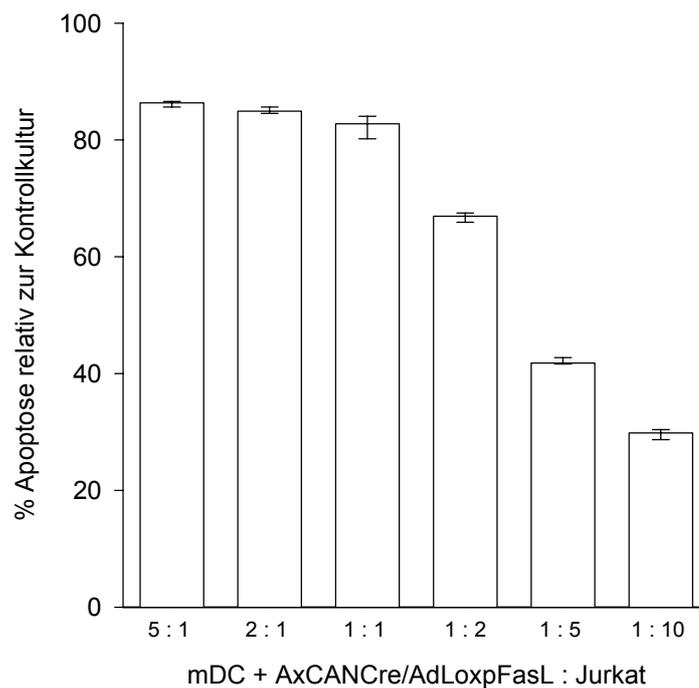


Abb. 19: Dosisabhängigkeit der Apoptoseinduktion durch mDC-FasL. Die mit ^3H -Methyl-Thymidin markierten Jurkat T-Zellen wurden in einem JAM-Test mit verschiedenen Mengen mDC-FasL für 5 Stunden inkubiert. Dargestellt sind die Mediane und 25-75% Percentile der Apoptoseraten relativ zur unbehandelten Kontrollkultur.

Bei einem E:T-Verhältnis von 1:1 wurde nach 5 Stunden in mehr als 80% der Jurkat T-Zellen Apoptose induziert. Der Einsatz von mehr Effektorzellen pro Targetzelle brachte keine wesentlich höhere Apoptoserate (E:T-Verhältnis von 5:1 85% Apoptose). Wurden mehr Targetzellen im Verhältnis zu mDC-FasL eingesetzt (E:T-Verhältnis von 1:10), wurden immer noch bei ca. 30% der Jurkat T-Zellen Apoptose induziert.

Dies konnte die außergewöhnliche Fähigkeit der mDC-FasL, Apoptose bei den Jurkat T-Zellen zu induzieren, hervorheben.

III.3.1.2 Durchflusszytometrischer Nachweis der Apoptoseinduktion bei Jurkat T-Zellen

Der JAM-Test wird häufig kritisch bewertet, da in die Berechnung der spezifischen Apoptose die Apoptoserate der unbehandelten Kontrollkultur mit einbezogen wird (Shouan *et al.*, 1998). Daher wurden zur Bestätigung der Ergebnisse aus dem JAM-Test auch durchflusszytometrische Analysen mit Annexin V-FITC/PI-Färbungen durchgeführt. Jurkat T-Zellen wurden für 5 bzw. 24 Stunden mit mDC, mDC-EGFP oder mDC-FasL in einem E:T-Verhältnis von 1:5 kokultiviert. Zudem wurden Jurkat T-Zellen alleine oder mit dem agonistischen anti-Fas-Antikörper CH11 inkubiert. Zu den entsprechenden Zeitpunkten

wurden die Zellen mit Annexin V-FITC/PI gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives von insgesamt neun Experimenten.

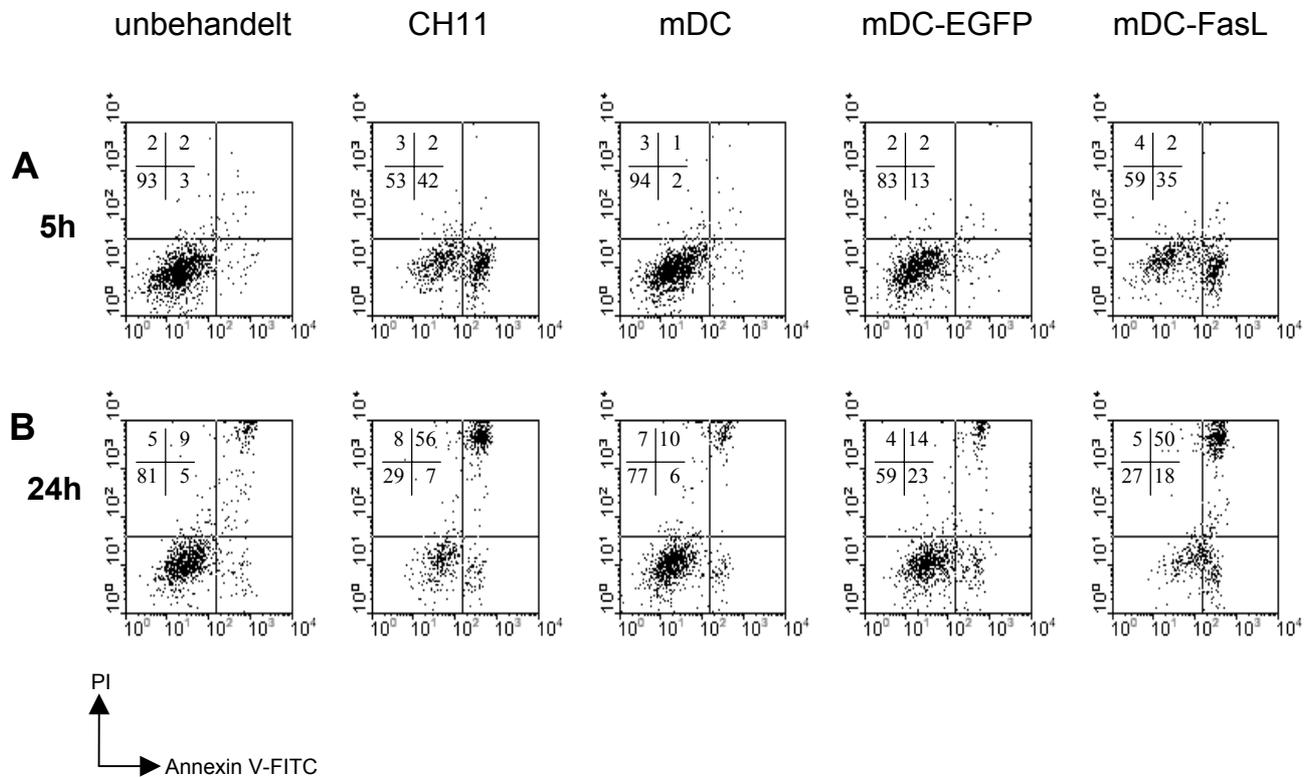


Abb. 20: Apoptosefärbung der Jurkat T-Zellen nach Kokultur mit mDC-FasL. Jurkat T-Zellen wurden im Verhältnis 1:5 mit mDC-FasL und entsprechenden Kontroll-DC oder mit dem apoptoseinduzierenden Antikörper CH11 (1 µg/ml) für 5 (A) bzw. 24 Stunden (B) kokultiviert. Die Zellen wurden mit Annexin V-FITC/PI gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt sind Dotplots der Zweifarbenanalysen.

Wurden Jurkat T-Zellen für 5 Stunden (Abb. 20 A) mit einem apoptoseinduzierenden Antikörper oder mDC-FasL inkubiert, zeigten 42% (CH11) bzw. 35% (mDC-FasL) eine Annexin V-FITC⁺/PI⁻ Färbung, was einem frühen Stadium der Apoptose entspricht. Nach Kultivierung in Abwesenheit oder in Anwesenheit von Kontroll-DC (mDC und mDC-EGFP) konnte keine erhöhten Apoptoseraten gemessen werden. Wurde die Inkubation dieser Ansätze auf 24 Stunden ausgedehnt (Abb. 20 B), konnten nur noch wenige früh apoptotische Zellen (Annexin V-FITC⁺/PI⁻, bei Inkubation mit CH11 7%, mit mDC-FasL 18%) nachgewiesen werden. Jedoch stieg der Anteil spät apoptotischer bzw. sekundär nekrotischer Zellen (Annexin V-FITC⁺/PI⁺) auf 56% nach CH11-Behandlung bzw. auf 50% nach Kokultur mit mDC-FasL. In den Kontrollansätzen waren nach 24 Stunden auch früh und spät apoptotische Zellen nachweisbar, deren Anteil jedoch weit unter dem der Kulturen mit

apoptoseinduzierendem Antikörper oder mDC-FasL lag und der „Hintergrund-Apoptose“ unbehandelter Jurkat T-Zellen entsprach.

Somit konnte durch eine weitere Methode gezeigt werden, dass nur FasL-exprimierende DC Apoptose in Fas⁺ Targetzellen induzierten.

III.3.1.3 *Blockierung der FasL-induzierten Apoptose*

Als nächstes wurden Blockierungsexperimente durchgeführt, um zu klären, ob die Apoptose der Jurkat T-Zellen tatsächlich durch die Interaktion von FasL-exprimierenden mDC-FasL mit Fas auf der Oberfläche der Targetzellen ausgelöst wurde. Dazu wurden Jurkat T-Zellen und mDC-FasL in einem E:T-Verhältnis von 1:5 für 5 bzw. 24 Stunden in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen (1-20 µg/ml) des FasL-blockierenden Antikörpers (Klon Kay-10; Kayagaki *et al.*, 1997) oder der entsprechenden Isotypkontrolle (Maus-anti-Maus IgG2b) inkubiert. Analysiert wurden die Proben nach Färbung mit Annexin V-FITC/PI im Durchflusszytometer.

Der Zusatz des FasL-blockierenden Antikörpers konnte dosisabhängig die Apoptoseinduktion durch mDC-FasL aufheben: Je mehr anti-FasL-Antikörper zugegeben wurde, desto weniger Zellen zeigten nach 5 Stunden Kokultur eine Annexin V-FITC⁺/PI⁻ Färbung (**Abb. 21 A**). Der Einsatz der Isotypkontrolle konnte die Apoptoseinduktion nicht unterdrücken, die Apoptoseraten waren vergleichbar mit denen der Kokulturen von mDC-FasL ohne Zusatz eines Antikörpers. Dieser Effekt ließ sich auch noch nach 24 Stunden beobachten (**Abb. 21 B**). In den Kokulturen mit mDC-FasL konnten nur noch wenige Annexin V-FITC⁺/PI⁻ Jurkat T-Zellen nachgewiesen werden, die Mehrzahl der Jurkat T-Zellen war positiv für Annexin V-FITC und PI, also in einem späten Stadium der Apoptose.

Dieses Experiment zeigte, dass die Apoptoseinduktion in den Jurkat T-Zellen durch die Interaktion von FasL auf der Oberfläche der transduzierten mDC mit Fas auf den Targetzellen vermittelt wurde.

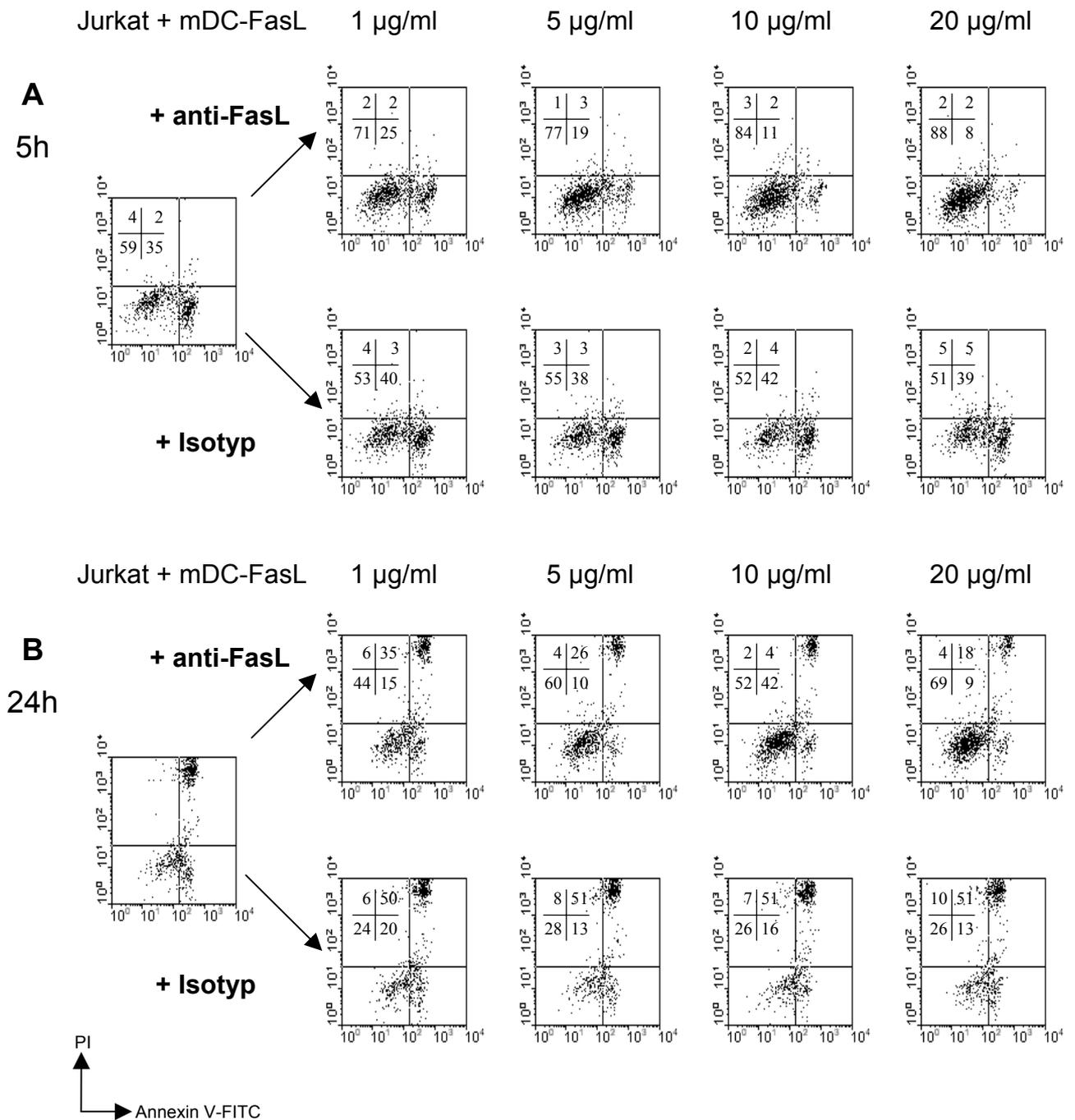


Abb. 21: Blockierung der FasL-induzierten Apoptose bei Jurkat T-Zellen. Jurkat T-Zellen wurden im Verhältnis 1:5 mit mDC-FasL und verschiedenen Mengen des FasL-blockierenden Antikörpers Kay-10 oder der entsprechenden Isotypkontrolle inkubiert. Als Kontrolle wurde eine Kokultur von mDC-FasL mit Jurkat T-Zellen ohne den Zusatz eines Antikörpers angesetzt. Nach 5 (A) bzw. 24 Stunden (B) wurde eine Annexin V-FITC/PI-Färbung durchgeführt und im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt sind Dotplots der Zweifarbenanalyse.

III.4 Eliminierung primärer humaner T-Lymphozyten nach polyklonaler Aktivierung

Da die Jurkat T-Zelllinie als besonders sensitiv für die Fas-vermittelte Apoptose beschrieben wird (Weis *et al.*, 1995), sollte in den folgenden Untersuchungen analysiert werden, ob mDC-FasL auch primäre humane T-Lymphozyten eliminieren können.

Für die Experimente mit primären humanen T-Lymphozyten wurden ausschließlich mDC verwendet, die mit den adenoviralen Vektoren AxCANCre plus AdloxPFasL transduziert wurden. Als Kontrollen dienten unbehandelte mDC oder transduzierte mDC-EGFP. An Tag 3 nach der Transduktion wurden die DC in den Experimenten mit den primären T-Lymphozyten eingesetzt.

III.4.1 Eliminierung aktivierter T-Lymphozyten durch mDC-FasL

III.4.1.1 *Proliferation und Apoptose von primären T-Zellen in Kokulturen mit mDC-FasL*

Die Proliferation lässt Aussagen über die Stimulationsfähigkeit von T-Lymphozyten zu und ist ein sehr sensibler funktioneller Parameter. Die Kokultur polyklonal voraktivierter T-Lymphozyten mit allogenen mDC gibt Aufschluss über eine weitere Aktivierbarkeit.

Zur polyklonalen Stimulation wurden die T-Zellen mit aktivierenden anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern sowie dem Zytokin IL-2 für 6 Tage inkubiert. Als ruhende T-Lymphozyten wurden frisch aufgetaute T-Lymphozytenfraktionen in den Kokulturen eingesetzt. Für einen Proliferationstest wurden 5×10^4 der aktivierten oder ruhenden T-Zellen mit verschiedenen Mengen an mDC, mDC-EGFP und mDC-FasL für 24 Stunden inkubiert.

Abb. 22 zeigt die Ergebnisse eines von insgesamt vier vergleichbaren Experimenten.

Die Auswertung ergab, dass die mDC-FasL dosisabhängig die Proliferation aktivierter T-Lymphozyten unterdrücken konnten (**Abb. 22 A**). Dieser Effekt konnte dagegen nicht bei Kokulturen aktivierter T-Lymphozyten mit mDC oder mDC-EGFP beobachtet werden. Wurden ruhende T-Lymphozyten in den Kokulturen eingesetzt, hatten weder mDC-FasL noch Kontroll-DC einen Einfluss auf die Proliferation (**Abb. 22 B**). Die Inkubationszeit war allerdings in diesem Ansatz für die Induktion einer allogenen proliferativen Antwort der nicht aktivierten T-Zellen zu kurz gewählt.

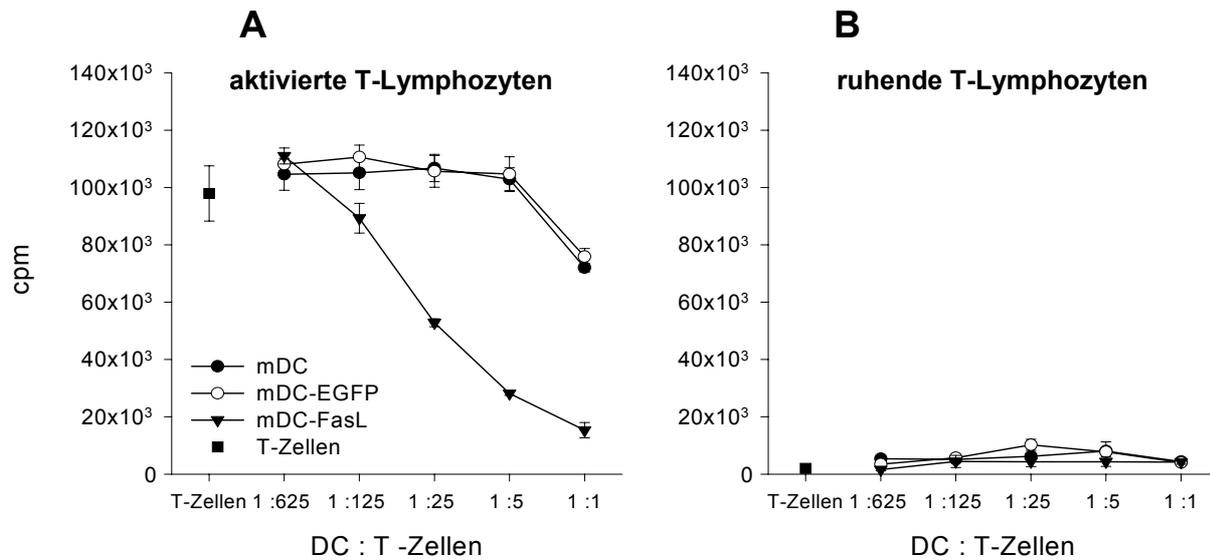


Abb. 22: Proliferation von aktivierten T-Lymphozyten in Kokulturen mit mDC-FasL. Polyklonal aktivierte (A) und ruhende T-Lymphozyten (B) wurden mit mDC, mDC-EGFP und mDC-FasL in verschiedenen Verhältnissen für 24 Stunden kokultiviert, wobei in den letzten 20 Stunden ³H-Methyl-Thymidin zugegeben wurde. Dargestellt ist die Inkorporation von ³H-Methyl-Thymidin der T-Lymphozyten als Mittelwerte der cpm ± SD.

Die Analyse der Oberflächenmarker auf mDC-FasL (III.2.3.3) sowie die funktionellen Daten der Kokulturen mit Jurkat T-Zellen ließen vermuten, dass die verminderten Proliferationsraten der aktivierten T-Lymphozyten auf Fas-vermittelte Eliminierung dieser Zellen zurückzuführen sind. Um dies zu untersuchen, wurden Kokulturen von aktivierten oder ruhenden T-Lymphozyten mit mDC-FasL und den Kontroll-DC im Verhältnis von 1:5 etabliert. Als Kontrolle zur Apoptoseinduktion wurden T-Lymphozyten ohne Effektorzellen unbehandelt oder mit dem agonistischen anti-Fas-Antikörper (CH11, Endkonzentration 1 µg/ml) inkubiert. Eine Annexin V-FITC/PI-Färbung wurde nach 5 und 24 Stunden Inkubationszeit durchgeführt. In **Abb. 23** ist eines von insgesamt vier vergleichbaren Experimenten dargestellt.

In den Kokulturen mit mDC-FasL konnte nach 5 Stunden bei 47% der aktivierten T-Lymphozyten Apoptose nachgewiesen werden (**Abb. 23 A**). Der Prozentsatz erhöhte sich nach 24 Stunden Kokultur auf insgesamt 75% apoptotische Zellen (**Abb. 23 B**). In Kokulturen von aktivierten T-Lymphozyten mit den Kontroll-DC (mDC oder mDC-EGFP) konnten nach 5 Stunden jeweils ca. 20% und nach 24 Stunden insgesamt ca. 30% apoptotische Zellen detektiert werden. Im Vergleich zu der durch mDC-FasL induzierten Apoptose war die Apoptoseinduktion mit dem anti-Fas-Antikörper CH11 deutlich schwächer ausgeprägt. Nach 5 Stunden Kokultur konnten nur 32% und nach 24 Stunden nur 53%

apoptotische T-Lymphozyten ermittelt werden. Bei nicht aktivierten T-Zellen konnten weder der agonistische anti-Fas-Antikörper noch mDC-FasL erhöhte Apoptoseraten induzieren.

Diese Ergebnisse zeigten, dass mDC-FasL nur in aktivierten T-Lymphozyten Apoptose auslösen konnten. Ruhende T-Lymphozyten waren dagegen vor der Apoptoseinduktion geschützt.

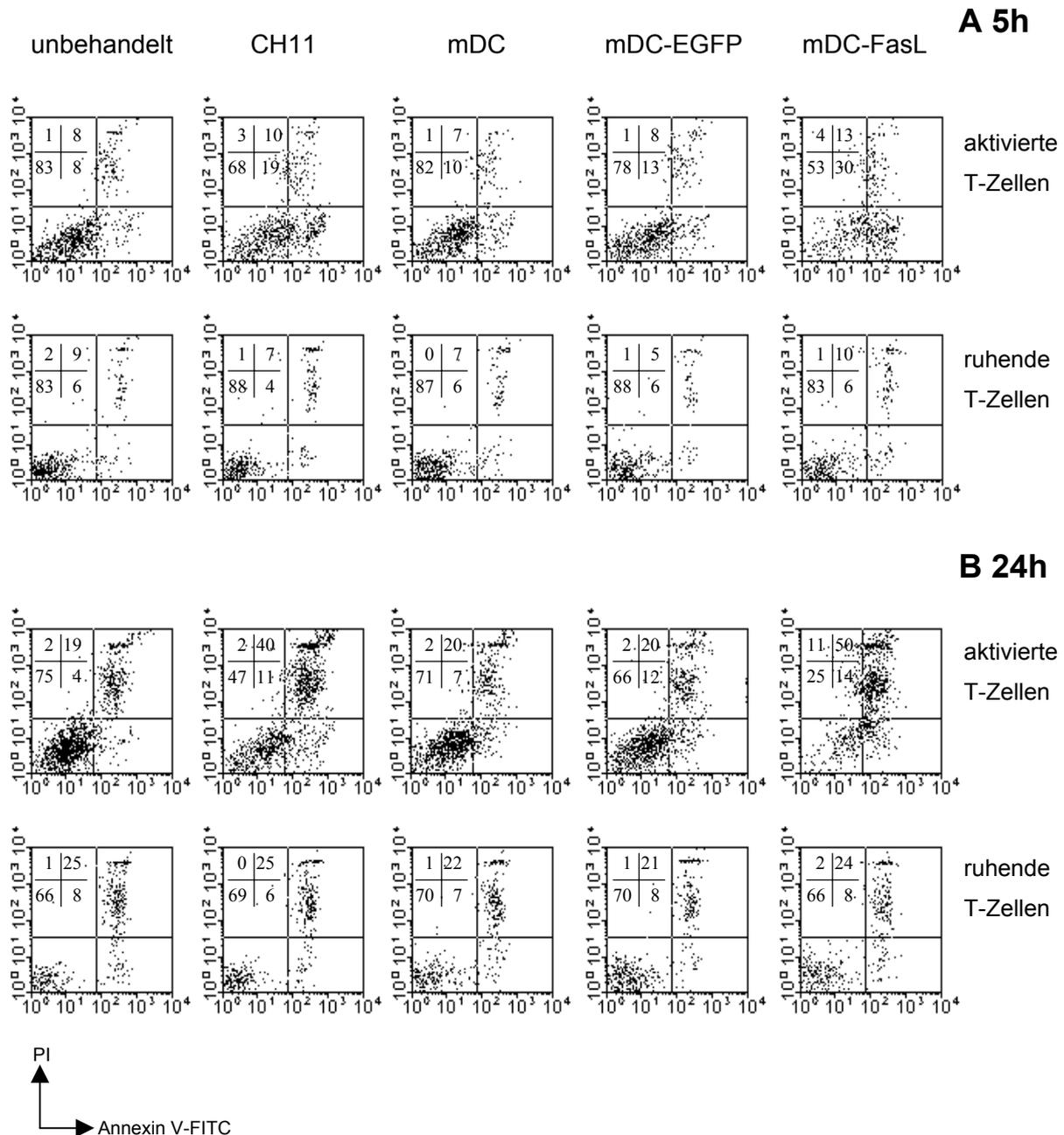


Abb. 23: Annexin V-FITC/PI-Färbung aktivierter und ruhender T-Lymphozyten nach Kokultur mit mDC-FasL. Aktivierte und ruhende T-Lymphozyten wurden im Verhältnis 1:5 mit mDC, mDC-EGFP und mDC-FasL inkubiert. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne Effektorzellen, denen nichts oder ein agonistischer anti-Fas-Antikörper CH11 (1µg/ml) zugegeben wurde. Die Ansätze wurden 5 (A) bzw. 24 Stunden (B) nach Beginn der Kokultur mit Annexin V-FITC/PI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind Dotplots der Zweifarbenanalysen.

III.4.2 Untersuchung aktivierter T-Zellsubpopulationen

Es konnte gezeigt werden, dass mDC-FasL nur bei den aktivierten nicht aber bei den ruhenden T-Lymphozyten Apoptose induzierten, wobei in diesen Experimenten die gesamten T-Zellfraktionen aus der Elutriation eingesetzt wurden. Deshalb wurde als nächstes untersucht, ob sich einzelne T-Zellsubpopulationen in der Apoptoseinduktion durch mDC-FasL unterscheiden. Dazu wurden $CD4^+$ T-Lymphozyten (T-Helferzellen) und $CD8^+$ T-Lymphozyten (zytotoxische T-Zellen, CTL) für die folgenden Experimente aufgereinigt und voneinander getrennt eingesetzt.

III.4.2.1 Aktivierungsmarker auf aktivierten $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen

$CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten wurden durch positive Selektion mit MicroBeads aus lymphozytenreichen Elutriationsfraktionen gewonnen und bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Stimulation wurden die Zellen schnell aufgetaut und jeweils mit anti-CD3-, anti-CD28-Antikörpern und dem Zytokin IL-2 für 6 Tage in 96-Well Rundboden-Mikrotiterplatten kultiviert. Vor der Stimulation und 6 Tage nach Beginn der Stimulation wurden Aliquots der Zellen entnommen und Analysen im FACS durchgeführt. Als Aktivierungsmarker für T-Lymphozyten wurden CD25, CD69, Fas und FasL (alle PE-konjugiert) in Kombination mit dem jeweiligen T-Zellantigen (CD4 oder CD8, beide FITC-markiert) bestimmt. In **Abb. 24** ist eines von insgesamt 5 vergleichbaren Experimenten dargestellt.

Weder $CD4^+$ (**Abb. 24 A**) noch $CD8^+$ T-Lymphozyten (**Abb. 24 B**) wiesen vor der polyklonalen Stimulation eine starke Expression der Aktivierungsmarker CD25, CD69, Fas oder FasL auf. Nur einige wenige Zellen waren schwach positiv für CD25, CD69 oder Fas, so dass die Mehrzahl der T-Lymphozyten einen ruhenden Phänotyp aufwies. FasL konnte nur bei einem geringen Teil der ruhenden $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Die Inkubation mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern in Kombination mit IL-2 simuliert eine Antigenstimulation der T-Lymphozyten durch DC, wie sie zum Beispiel auch in einer MLR auftritt. Sechs Tage nach polyklonaler Stimulation zeigten sowohl $CD4^+$ (**Abb. 24 A**) als auch $CD8^+$ T-Zellen (**Abb. 24 B**) eine starke Expression der Aktivierungsmarker CD25, CD69 und Fas auf der Zelloberfläche. Auf beiden T-Zellsubpopulationen wurde dagegen nur auf wenigen Zellen eine schwache Expression des humanen FasL festgestellt.

Die durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenantigene ergab, dass nur aktivierte $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten eine homogene, starke Fas-Expression aufwiesen.

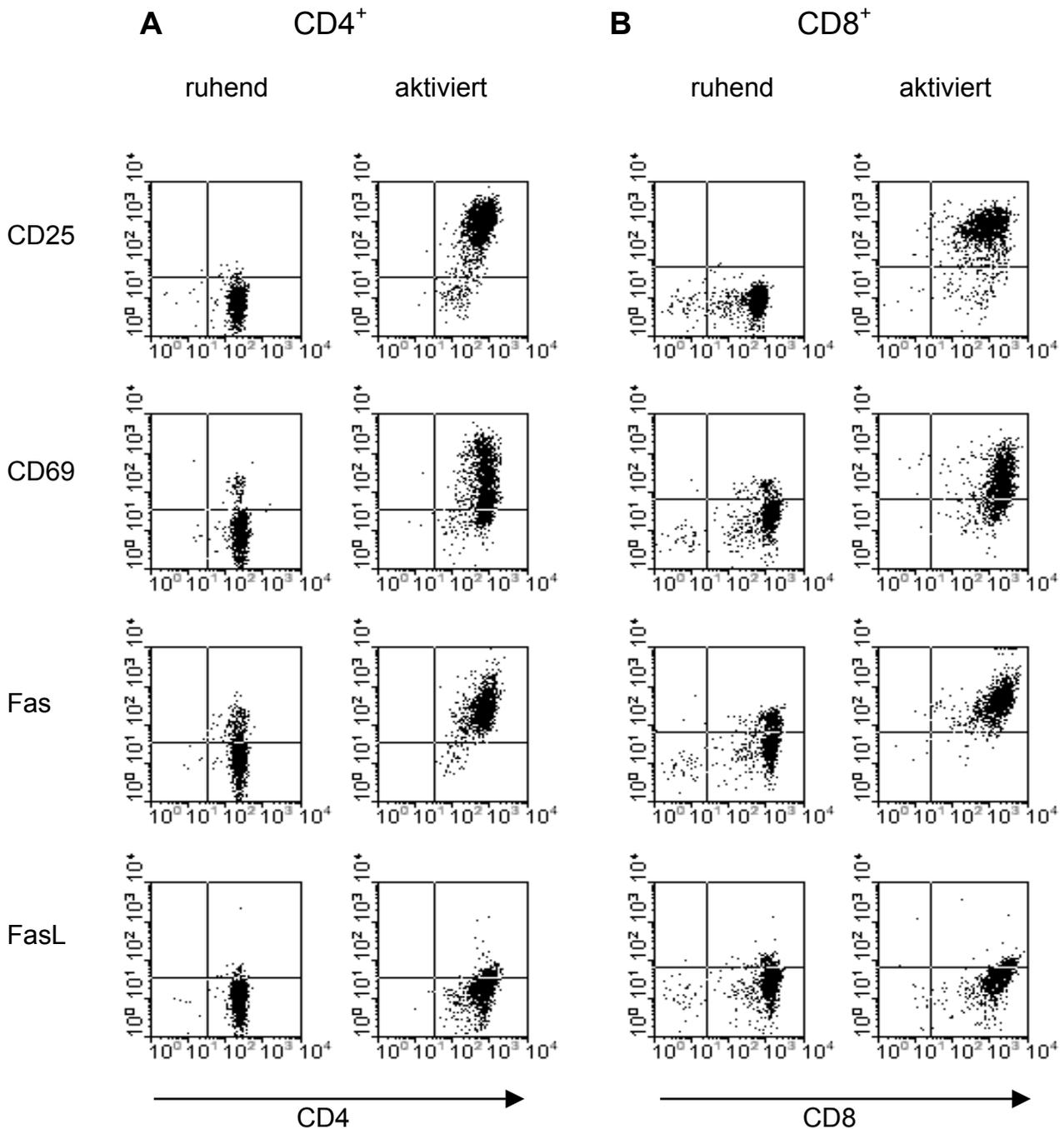


Abb. 24: Aktivierungsmarker auf $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten nach polyklonaler Stimulation. $CD4^+$ (A) und $CD8^+$ T-Lymphozyten (B) wurden mit aktivierenden Antikörpern gegen CD3 und CD28 und dem Zytokin IL-2 für 6 Tage stimuliert. Vor Beginn der Aktivierung (ruhende T-Lymphozyten) und sechs Tage nach Stimulation (aktivierte T-Lymphozyten) wurden Aliquots der Zellen für eine Zweifarbenanalyse im Durchflusszytometer gefärbt. Dabei wurden die T-Zellantigene CD4 und CD8 mit FITC-konjugierten und die Aktivierungsmarker gleichzeitig mit PE-konjugierten Antikörpern gefärbt. Dargestellt sind Dotplots der Zweifarbenanalyse.

III.4.2.2 Proliferation aktivierter T-Lymphozyten in Kokulturen mit mDC-FasL

Um die Funktionalität der FasL-Expression der mDC-FasL bei aktivierten T-Lymphozyten zu untersuchen, wurden polyklonal aktivierte und nicht stimulierte $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen (je 5×10^4) mit verschiedenen Mengen von mDC, mDC-EGFP und mDC-FasL für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die 3H -Thymidin-Inkorporation in den T-Zellen gemessen. Dargestellt ist ein repräsentatives von insgesamt drei Experimenten.

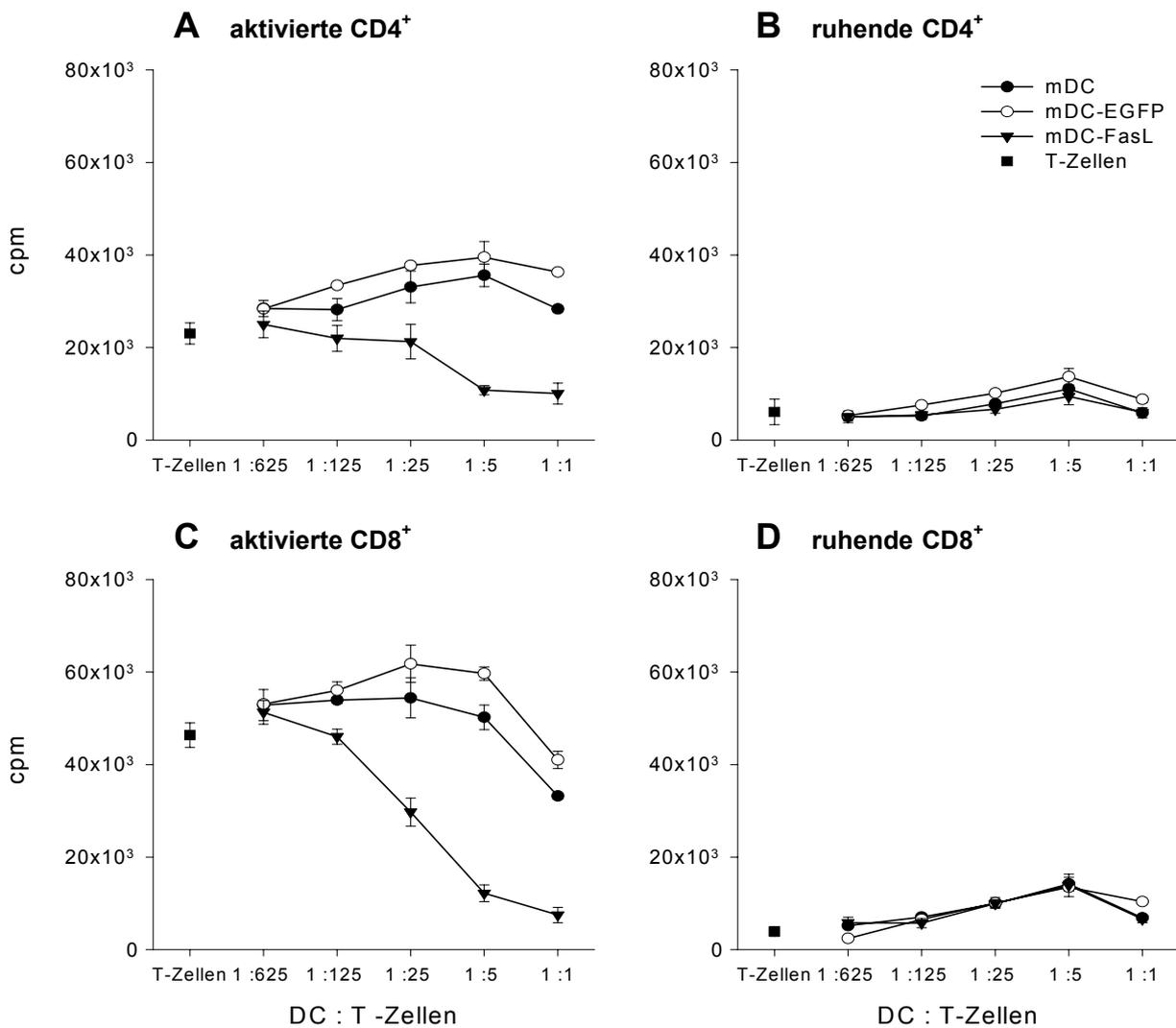


Abb. 25: Proliferation aktivierter und nicht aktivierter $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Lymphozyten mit mDC-FasL. Aktivierte $CD4^+$ (A) oder $CD8^+$ T-Lymphozyten (C) oder ruhende $CD4^+$ (B) und $CD8^+$ T-Lymphozyten (D) wurden mit mDC-FasL oder den entsprechenden Kontroll-DC kultiviert. Nach 48 Stunden Inkubation wurde die 3H -Thymidin-Inkorporation gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte der cpm \pm SD.

Die Kokultivierung aktivierter T-Lymphozyten mit mDC-FasL führte zu einer dosisabhängigen Verminderung der Proliferation sowohl bei $CD4^+$ (Abb. 25 A) als auch $CD8^+$ T-Zellen (Abb. 25 C). Schon bei einer geringen Menge an mDC-FasL (E:T-Verhältnis

von 1:125) konnte sowohl bei CD4⁺ als auch bei CD8⁺ T-Lymphozyten im Vergleich zu den Kokulturen mit Kontroll-DC eine Verminderung der Proliferation festgestellt werden. Je mehr mDC-FasL zu den T-Lymphozyten gegeben wurden, desto weniger ³H-Methyl-Thymidin wurde von den T-Zellen inkorporiert. Wurden diese aktivierten T-Lymphozyten zusammen mit den Kontroll-DC kultiviert, konnte dagegen keine Reduktion der Proliferation festgestellt werden. Die Kultivierung der ruhenden CD4⁺ (**Abb. 25 B**) und CD8⁺ T-Lymphozyten (**Abb. 25 D**) mit mDC, mDC-EGFP oder mDC-FasL induzierte gleichermaßen eine leichte Proliferation. Dies könnte auf eine beginnende allogene Stimulation der ruhenden T-Lymphozyten zurückzuführen sein.

III.4.2.3 Apoptoseinduktion bei aktivierten T-Zellsubpopulationen durch mDC-FasL

Auf Grund der untersuchten Oberflächenmarker sollten auch mDC-FasL in der Lage sein, T-Lymphozyten optimal zu stimulieren (III.2.3.3). Eine Annexin V-FITC/PI-Färbung wurde durchgeführt, um zu untersuchen, ob die verminderte Proliferation aktivierter T-Zellen in den Kokulturen mit mDC-FasL auf eine Apoptoseinduktion zurückzuführen war. Hierfür wurden parallel zu dem im vorhergehenden Absatz dargestellten Proliferationstest (**Abb. 25**) die gleichen Zellen auch durchflusszytometrisch analysiert. Dazu wurden polyklonal aktivierte CD4⁺ oder CD8⁺ T-Lymphozyten in einem Verhältnis von 1:5 mit mDC, mDC-EGFP oder mDC-FasL für 48 Stunden kokultiviert. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne Effektorzellen, die entweder unbehandelt blieben oder mit dem agonistischen anti-Fas-Antikörper (CH11, Endkonzentration 1 µg/ml) versetzt wurden.

In den Kokulturen der mDC-FasL mit CD4⁺ (**Abb. 26 A**) oder CD8⁺ T-Lymphozyten (**Abb. 26 B**) konnten deutlich erhöhte Apoptoseraten (gesamt apoptotische Zellen: CD4⁺ 47%, CD8⁺ 54%) im Vergleich zu den Kokulturen mit Kontroll-DC (mDC und mDC-EGFP) und T-Lymphozyten festgestellt werden (jeweils gesamt apoptotische Zellen: CD4⁺ ~8%, CD8⁺ ~22%). Vor dem Hintergrund der spontanen Apoptose zeigte sich eine vergleichbare Apoptoseinduktion durch mDC-FasL bei CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Nach der Behandlung mit dem agonistischen anti-Fas-Antikörper CH11 konnten sowohl in Kulturen mit CD4⁺ (gesamt apoptotische Zellen 27%) als auch mit CD8⁺ T-Lymphozyten (40%) erhöhte Apoptoseraten gemessen werden, die jedoch wesentlich niedriger lagen als nach Kokultur mit mDC-FasL.

Diese Ergebnisse zeigten, dass primäre humane T-Lymphozyten erst nach Aktivierung sensitiv für die Fas-vermittelte Apoptose wurden. Dabei konnten durch mDC-FasL sowohl $CD4^+$ als auch $CD8^+$ T-Zellsubpopulationen gleichermaßen effizient eliminiert werden.

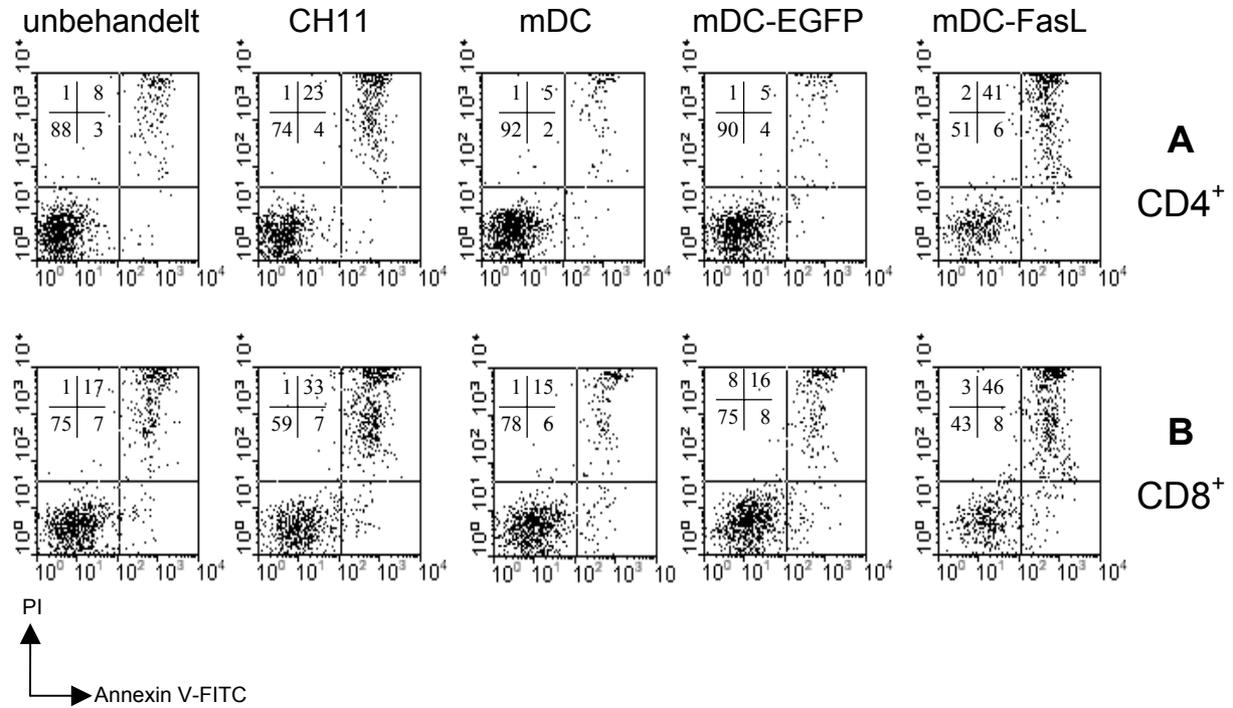


Abb. 26: Annexin V-FITC/PI-Färbung aktivierter $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Lymphozyten nach Kultur mit mDC-FasL. Aktivierte $CD4^+$ (A) oder $CD8^+$ T-Lymphozyten (B) wurden mit mDC, mDC-EGFP oder mDC-FasL kokultiviert. Als Kontrollansätze wurden die T-Lymphozyten unbehandelt oder in Anwesenheit des agonistischen anti-Fas-Antikörpers CH11 (1 μ g/ml) inkubiert. Nach 48 Stunden wurde eine Färbung mit Annexin V-FITC/PI durchgeführt und im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt sind Dotplots der Zweifarbenanalyse.

III.4.2.4 Inhibierung der mDC-FasL-vermittelten Apoptose bei aktivierten T-Lymphozytenpopulationen

Als nächstes wurden Blockierungsexperimente durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Apoptoseinduktion bei T-Lymphozyten wirklich durch die FasL-Expression der DC hervorgerufen wurde. Dazu wurden aktivierte $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten im Verhältnis 1:5 mit mDC-FasL für 5 und 48 Stunden kokultiviert. Zu diesen Kokulturen wurde entweder der blockierende anti-FasL-Antikörper (Maus-anti-Maus-FasL, Klon Kay-10) oder die entsprechende Isotypkontrolle (Maus IgG_{2b}, Klon MPC-11) in Konzentrationen von 2,5 μ g/ml bis 20 μ g/ml zugegeben. Als Kontrolle diente eine Kokultur mit mDC-FasL, der kein Antikörper zugesetzt wurde. Nach 5 und 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen mit

Annexin V-FITC/PI zur Detektion von Apoptose gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Eines von zwei vergleichbaren Experimenten ist in **Abb. 27** dargestellt, wobei der prozentuale Anteil der aller apoptotischen Zellen aufgetragen wurde.

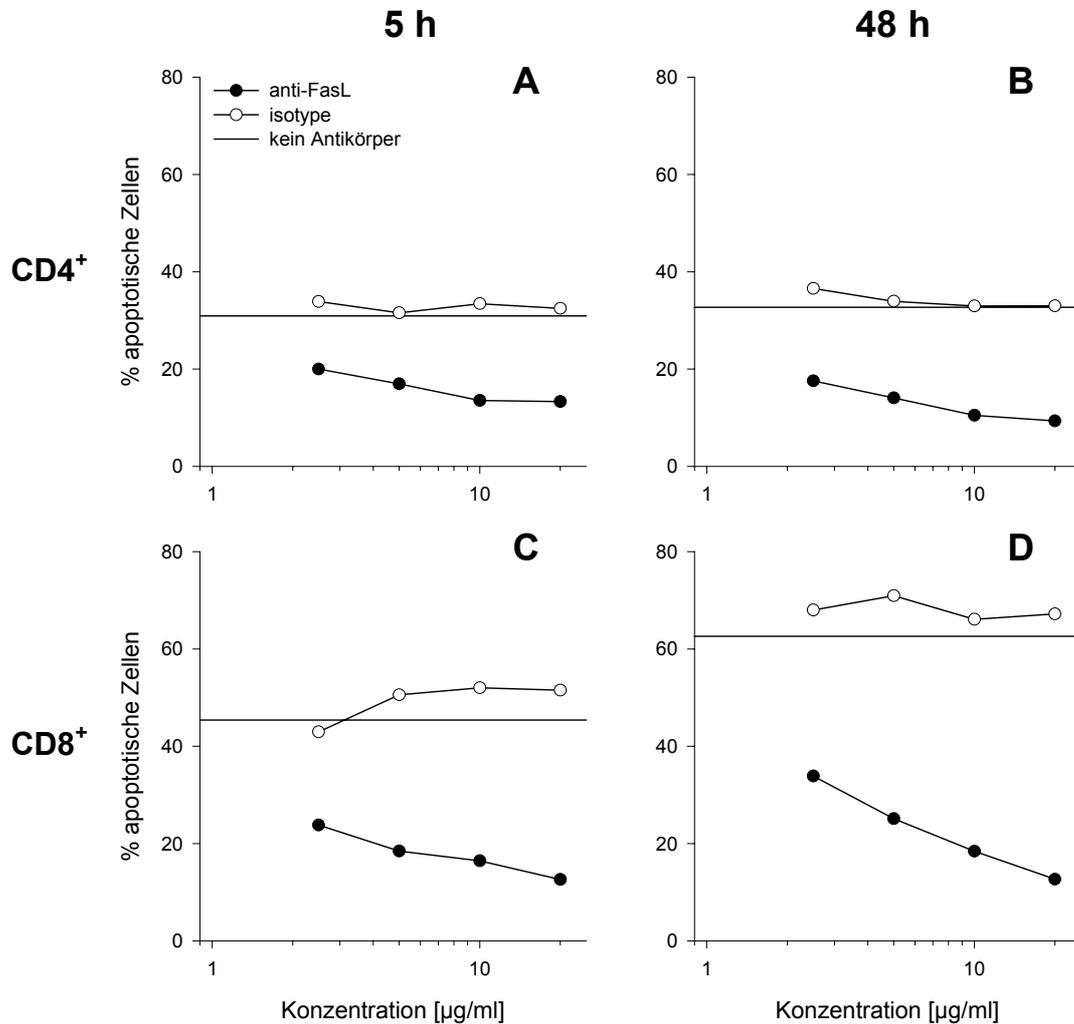


Abb. 27: Blockierung der FasL-induzierten Apoptose bei CD4⁺ oder CD8⁺ T-Lymphozyten. Polyklonal aktivierte CD4⁺ (A und B) und CD8⁺ T-Lymphozyten (C und D) wurden mit mDC-FasL im Verhältnis von 1:5 kokultiviert. Den Kokulturen wurde der FasL-blockierende Antikörper Kay-10 oder die entsprechende Isotypkontrolle in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Als Kontrollkulturen wurden T-Lymphozyten mit mDC-FasL ohne Zusatz eines Antikörpers kokultiviert. Nach 5 (A und C) und 48 Stunden (B und D) wurde eine Annexin V-FITC/PI-Färbung durchgeführt. Dargestellt sind die prozentualen Anteile apoptotischer Zellen der gesamten T-Zellen.

Sowohl nach 5 Stunden (**Abb. 27 A und C**) als auch nach 48 Stunden (**Abb. 27 B und D**) konnte in Kokulturen von mDC-FasL mit CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten in Anwesenheit des blockierenden anti-FasL-Antikörpers Kay-10 eine dosisabhängige Inhibierung der FasL-induzierten Apoptose beobachtet werden. Die mit den entsprechenden Konzentrationen der Isotypkontrolle behandelten Kokulturen wiesen Apoptoseraten vergleichbar mit denen der Referenzkulturen ohne Antikörper auf. Bei den CD8⁺ T-Lymphozyten war nach 48 Stunden

(**Abb. 27 D**) im Vergleich zu den Kokulturen über 5 Stunden (**Abb. 27 B**) eine deutliche Steigerung der Apoptoserate festzustellen (5 Stunden: 45%, 48 Stunden: 63%). Dieser Effekt war bei $CD4^+$ T-Lymphozyten nicht zu beobachten (**Abb. 27 A und B**, 5 Stunden: 31%, 48 Stunden: 33%).

III.4.2.5 Proliferation von aktivierten T-Lymphozytensubpopulationen in Kokulturen in Anwesenheit eines blockierenden anti-FasL-Antikörpers

Polyklonal aktivierte $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten wurden mit verschiedenen Mengen von mDC-FasL in einem Proliferationstest über 48 Stunden inkubiert. Zur Inhibierung der FasL-induzierten Apoptose wurde der FasL-blockierende Antikörper Kay-10 oder die entsprechende Isotypkontrolle in einer Endkonzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Als Kontrollansatz dienten Kokulturen von aktivierten T-Lymphozyten und mDC-FasL ohne den Zusatz eines Antikörpers. In **Abb. 28** ist eines von zwei vergleichbaren Experimenten dargestellt.

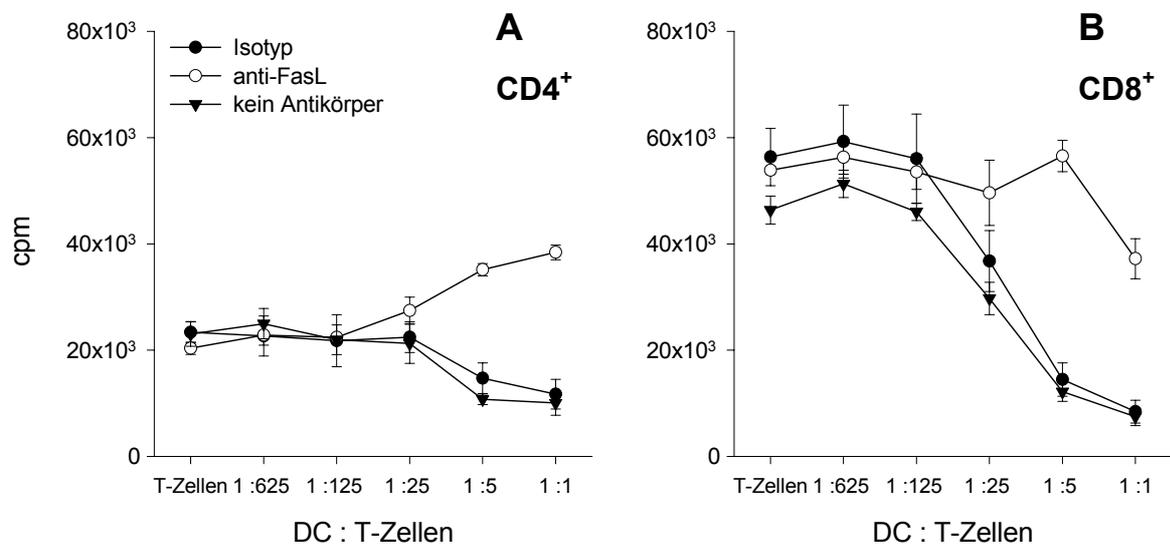


Abb. 28: Proliferation polyklonal aktivierter $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten mit mDC-FasL in Anwesenheit eines blockierenden anti-FasL-Antikörpers. Polyklonal aktivierte $CD4^+$ (A) und $CD8^+$ (B) T-Lymphozyten wurden mit mDC-FasL inkubiert. Den Kokulturen wurde der FasL-blockierende Antikörper Kay-10 oder die entsprechende Isotypkontrolle in einer Endkonzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ zugegeben. Als Kontrollansatz diente eine Kokultur, der kein Antikörper zugesetzt wurde. Nach 48 Stunden wurde die Inkorporation von ^3H -Methyl-Thymidin gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte der $\text{cpm} \pm \text{SD}$.

Bei der Kokultur von $CD4^+$ (**Abb. 28 A**) und $CD8^+$ (**Abb. 28 B**) T-Lymphozyten mit mDC-FasL konnte eine dosisabhängige Verminderung der Proliferation verzeichnet werden

(vgl. **Abb. 25 A** und **C**). In den Kontrollkulturen von aktivierten T-Zellen mit mDC-FasL in Anwesenheit der Isotypkontrolle wurde ein vergleichbarer, verminderter Einbau von ^3H -Methyl-Thymidin gemessen. Durch die Zugabe des FasL-blockierenden Antikörpers Kay-10 wurde jedoch die Proliferation der CD4^+ und CD8^+ T-Lymphozyten wiederhergestellt. Dabei wurden die CD4^+ und CD8^+ T-Zellen jedoch nicht in gleichem Maße wie in den Kokulturen mit mDC oder mDC-EGFP stimuliert (vergleiche **Abb. 25 A** und **C**). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der blockierende Antikörper in den Kulturen nicht ausreichend vorhanden war, um neusynthetisierten FasL komplett zu neutralisieren. Ein Teil der T-Lymphozyten könnte so durch FasL-vermittelte Apoptose eliminiert werden.

Die Ergebnisse der Blockierungsexperimente zeigten, dass tatsächlich die Fas-FasL-Interaktion zwischen mDC-FasL und den aktivierten T-Lymphozyten Ursache der Apoptoseinduktion war. Die Inhibierung von FasL durch den blockierenden Antikörper zeigte zudem, dass mDC-FasL die aktivierten T-Lymphozyten zur Proliferation stimulieren konnten.

III.4.2.6 Überstandstransfer-Experimente

Erste Untersuchungen zur Zytotoxizität von sFasL wurden im JAM-Test durch den Einsatz von Transwells durchgeführt (III.3.1.1). Die Ergebnisse dieser Versuche legten nahe, dass die FasL-vermittelte Apoptose vom Zellkontakt zwischen Effektor- und Targetzellen abhängig und die Rolle des sFasL in diesem System zu vernachlässigen war. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigten andere Untersuchungen (Tanaka *et al.*, 1996), dass Jurkat T-Zellen nicht durch humanen sFasL eliminiert wurden. Eine Arbeitsgruppen untersuchte den Effekt von Maus-sFasL (Schneider *et al.*, 1998) und konnte eine apoptoseinduzierende Wirkung auf Jurkat T-Zellen zeigen. Um den Einfluss von Maus-sFasL auf primäre T-Lymphozyten genauer zu untersuchen, wurden Überstandstransfer-Experimente durchgeführt.

Dazu wurden Jurkat T-Zellen und polyklonal aktivierte CD4^+ sowie CD8^+ T-Lymphozyten mit verschiedenen Volumina der Überstände von mDC, mDC-EGFP oder mDC-FasL (entnommen an Tag 3 nach der Transduktion) für 24 Stunden inkubiert. Nach dem Färben der Zellen mit Annexin V-FITC und PI wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. In den in **Abb. 29** dargestellten Diagrammen wurde der prozentuale Anteil aller apoptotischen Zellen gegen den prozentualen Anteil des konditionierten Mediums am Inkubationsvolumen aufgetragen. Dabei wurde von dem Anteil der apoptotische Zellen die „Hintergrund-Apoptose“ (Prozentsatz apoptotischer Zellen von Jurkat T-Zellen, CD4^+ bzw. CD8^+

T-Lymphozyten inkubiert mit 80% CellGro[®] Medium plus IL-4 und GM-CSF) abgezogen. Dargestellt ist eines von zwei Experimenten mit gleichem Ansatz.

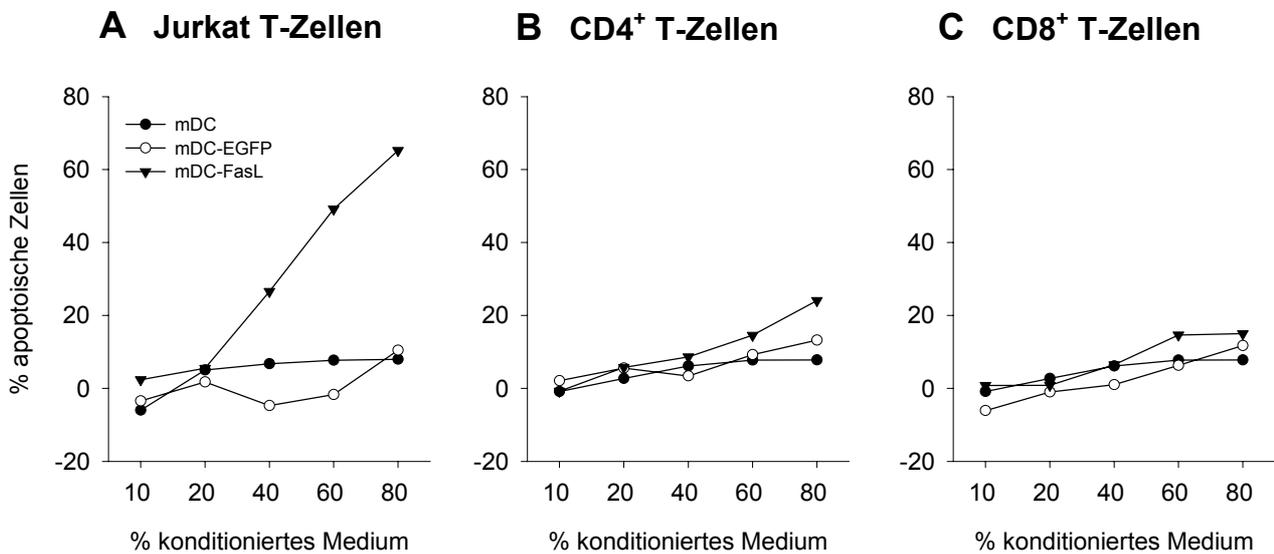


Abb. 29: Überstandstransfer von mDC-FasL auf Jurkat T-Zellen, CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten. Jurkat T-Zellen (A), aktivierte CD4⁺ (B) oder CD8⁺ (C) primäre humane T-Lymphozyten wurden mit steigenden Konzentrationen konditionierten Mediums für 24 Stunden inkubiert. Das konditionierte Medium wurde von mDC, mDC-EGFP oder mDC-FasL an Tag 3 nach der Transduktion abgenommen und direkt zu den T-Zellen gegeben. Der Prozentsatz apoptotischer Zellen wurde auf den Prozentsatz apoptotischer Zellen in den Kontrollkulturen normalisiert (s. Text).

Im Überstand von mDC-FasL konnte mit einem spezifischen ELISA die Konzentration des sFasL mit 7 ng/ml nachgewiesen werden. In den Überständen der untransduzierten mDC und mDC-EGFP konnte dagegen kein sFasL nachgewiesen werden. Nur bei Jurkat T-Zellen (Abb. 29 A) konnte durch sFasL-haltigen Überstand dosisabhängig Apoptose induziert werden. Die Inkubation mit Überständen von mDC oder mDC-EGFP löste hingegen keine Apoptose bei der Zelllinie aus. Bei den beiden aktivierten T-Zellsubpopulationen (Abb. 29 B und C) konnte durch den sFasL nur in sehr geringem Maße Apoptose induziert werden. Auch konditionierte Überstände von mDC und mDC-EGFP lösten bei diesen Zellen keine Apoptose aus.

Die Apoptoseinduktion durch sFasL schien also bei den primären T-Lymphozyten lediglich eine untergeordnete Rolle zu spielen.

III.5 Eliminierung allogen aktivierter humaner T-Lymphozyten

Die Stimulation von T-Lymphozyten mit Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD3 und CD28 in Kombination mit dem Zytokin IL-2 simuliert eine Stimulation durch allogene reife DC. In der MLR, dem klassischen Funktionalitätstest für die Interaktion zwischen Leukozyten verschiedener Spender, wird die Ungleichheit der MHC-Antigene der Stimulator- und Responderzellen ausgenutzt (McDevitt, 2000). Dieser Proliferationstest ist ein Modell für Alloreaktivität von T-Lymphozyten bei Transplantationen.

III.5.1 Proliferation allogen aktivierter T-Lymphozyten in Kokulturen mit mDC-FasL

Durch Vorversuche konnte eine optimale Aktivierung der T-Lymphozyten in Kokulturen mit allogenen mDC (MLR) bei einem Stimulator-Responder-Verhältnis von 1:5 bis 1:25 festgestellt werden (Abb. 14). Daher wurde für die allogene Aktivierung der T-Lymphozyten in größeren Ansätzen ein Verhältnis von 1:10 zu mDC gewählt. Die aktivierten T-Zellen wurden nach 6 Tagen aus den Kokulturen herausgenommen, in einer sekundären MLR mit mDC-FasL und Kontroll-DC des gleichen allogenen Spenders für 48 Stunden kokultiviert und die ^3H -Methyl-Thymidin Inkorporation gemessen. In Abb. 30 ist eines von insgesamt sechs vergleichbaren Experimenten dargestellt.

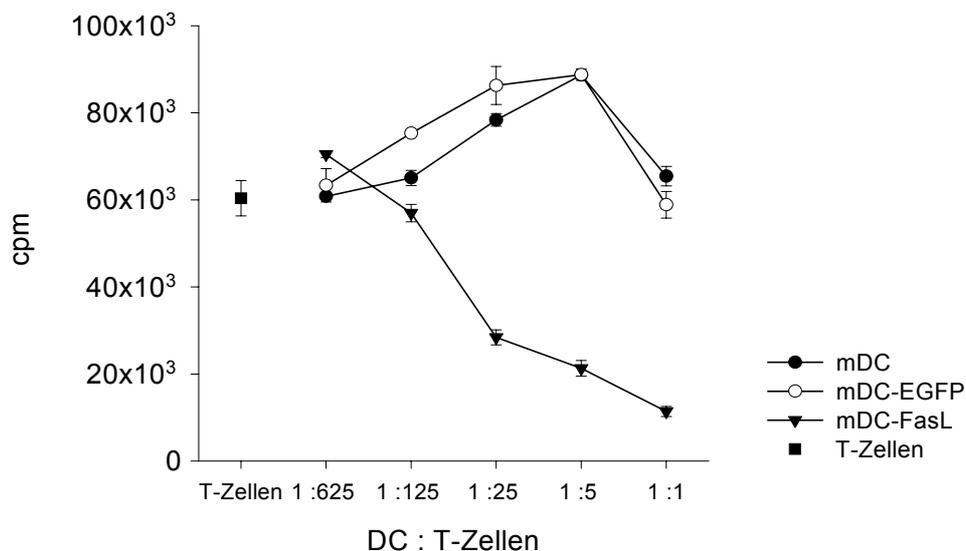


Abb. 30: Proliferation von allogen aktivierten T-Lymphozyten in Kokulturen mit mDC-FasL. T-Lymphozyten wurden in einer allogenen MLR mit mDC für 6 Tage im Verhältnis von 1:10 stimuliert. Anschließend wurden die T-Lymphozyten aus dieser Kokultur gerettet und in einer sekundären MLR eingesetzt. Als Stimulatorzellen wurden hier mDC-FasL, mDC oder mDC-EGFP des gleichen allogenen DC-Spenders verwendet. Nach 48 Stunden wurde die ^3H -Methyl-Thymidin Inkorporation bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der cpm \pm SD.

Nach Kokultur der allogenen aktivierten T-Lymphozyten mit mDC-FasL konnte eine Reduktion der Proliferation gegenüber den Kokulturen mit mDC oder mDC-EGFP festgestellt werden. Die Verminderung der ^3H -Methyl-Thymidin Inkorporation in Kokulturen mit mDC-FasL war abhängig vom Stimulator-Responder-Verhältnis: Je mehr DC eingesetzt wurden, desto schwächer war die Proliferation der T-Lymphozyten. Wurden aktivierte T-Lymphozyten und mDC-FasL zu gleichen Teilen eingesetzt, konnte die T-Zellproliferation fast vollständig unterdrückt werden. In Kokulturen mit den allogenen mDC oder mDC-EGFP wurden die T-Lymphozyten weiter zur Proliferation angeregt.

III.5.2 Apoptoseinduktion bei alloreaktiven T-Lymphozyten in Kokulturen mit mDC-FasL

Um zu untersuchen, ob die Verminderung der Proliferationsraten der T-Lymphozyten in der Kokultur mit mDC-FasL auf Apoptoseinduktion zurückzuführen war, wurde eine Annexin V-FITC/PI-Färbung durchgeführt und die Apoptoseraten durchflusszytometrisch ermittelt. Dazu wurden allogene aktivierte T-Lymphozyten im Verhältnis von 1:5 mit mDC-FasL für 48 Stunden kokultiviert. Als Kontrollkulturen dienten Ansätze mit unbehandelten mDC oder mDC-EGFP, zudem wurde die spontane Apoptose der T-Lymphozyten bestimmt. In **Abb. 31** ist eines von sechs vergleichbaren Experimenten dargestellt.

Nach 48 Stunden Kokultur konnten die mDC-FasL bei 68% der allogenen aktivierten T-Lymphozyten Apoptose induzieren. Hingegen wurde durch die Inkubation mit mDC (15%) und mDC-EGFP (19%) keine deutliche Steigerung der Apoptoseraten im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-Lymphozyten festgestellt (14% apoptotische Zellen).

Diese Experimente zeigten, dass auch alloreaktive T-Lymphozyten sehr effizient durch mDC-FasL eliminiert wurden.

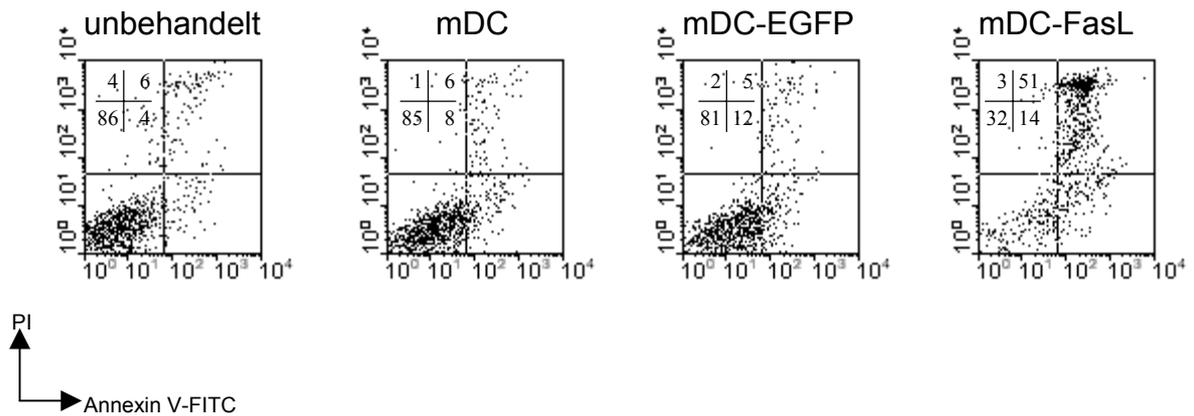


Abb. 31: Annexin V-FITC/PI-Färbung von T-Lymphozyten nach Kokultur mit mDC-FasL. T-Lymphozyten wurden für 6 Tage mit mDC eines allogenen Spenders kokultiviert und anschließend in einer sekundären MLR mit mDC-FasL für weitere 48 Stunden inkubiert. Zur Kontrolle wurden T-Lymphozyten mit mDC und mDC-EGFP kokultiviert oder mit dem agonistischen anti-Fas-Antikörper CH11 (1 µg/ml) versetzt. Dargestellt sind die Ergebnisse einer durchflusszytometrischen Analyse der Annexin V-FITC/PI-Färbung als Dotplots.

IV Diskussion

IV.1 Dendritische Zellen als antigenpräsentierende Zellen

In den vorliegenden Untersuchungen wurden DC als antigenpräsentierende Zellen (APC) eingesetzt, um nach Transduktion mit dem FasL-Gen als apoptoseinduzierende, immunmodulierende Zellen verwendet werden zu können. Das Konzept der FasL-exprimierenden „Killer-APC“ basiert darauf, dass die APC neben den beiden zur T-Zellaktivierung benötigten Signalen (Antigenpräsentation und Kostimulation) auch ein drittes Signal präsentierten, das die Deletion der T-Lymphozyten durch Apoptoseinduktion vermittelt. Verschiedene Zelltypen sind in der Lage, eine vollständige T-Zellstimulation zu leisten. Als sogenannte „professionelle“ APC gelten B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und DC. Von diesen sind die DC besonders effizient in der Stimulation von naiven T-Lymphozyten (Egner *et al.*, 1993). Sie exprimieren große Mengen an MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen sowie kostimulatorische Moleküle wie B7-1 und B7-2, die auf der Zelloberfläche der anderen professionellen APC schwächer exprimiert werden (Scheinecker *et al.*, 1998).

IV.1.1 *In vitro* Generierung von DC aus humanen Monozyten

Nur 0,1 bis 0,9% der im peripheren Blut vorhandenen Leukozyten sind DC (Fearnley *et al.*, 1999; Szabolcs *et al.*, 2003), deren Isolation zeitintensiv und aufwendig ist. Der weitaus größte Teil der DC ist in Geweben wie z. B. der Haut, der Lunge oder der Leber, vor allem aber in den primären und sekundären lymphatischen Organen wie Knochenmark, Thymus, Milz und den Lymphknoten lokalisiert (Shortman & Liu, 2002). Die für die hier durchgeführten Experimente erforderlichen großen Mengen an FasL-exprimierenden DC konnten deshalb nicht durch direkte Isolation aus dem peripheren Blut gewonnen werden.

Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden Protokolle zur *in vitro* Generierung humaner DC aus unterschiedlichen Vorläuferzellen entwickelt (Sallusto & Lanzavecchia, 1994; Zhou & Tedder, 1996). Dies ermöglicht die Bereitstellung großer DC-Mengen, die auch in klinischen Studien eingesetzt werden (Kirk & Mule, 2000; Banchereau *et al.*, 2001; Gunzer *et al.*, 2001; Berger *et al.*, 2002). Allerdings unterscheiden sich diese *in vitro* differenzierten DC-Populationen je nach den verwendeten Ausgangszellen sowie den gewählten Kulturbedingungen erheblich voneinander (Ardavin *et al.*, 2001). Eine sorgfältige Kontrolle

dieser Bedingungen und die genaue Analyse der daraus resultierenden phänotypischen und funktionellen Merkmale der DC ist daher unerlässlich.

In den hier vorgestellten Untersuchungen wurden DC verwendet, die aus elutrierten Monozyten unter serumfreien Bedingungen in Anwesenheit von IL-4 und GM-CSF generiert wurden. Die Differenzierung von DC aus Monozyten durch Zugabe dieser Zytokine zum Kulturmedium ist inzwischen eine weit verbreitete Methode zur Gewinnung sogenannter „von Monozyten abstammender“ DC (Sallusto & Lanzavecchia, 1994; Romani *et al.*, 1996; Zhou & Tedder, 1996). Die Monozyten werden dabei in der Regel durch Monozytenadhärenz (Grassi *et al.*, 1998), Elutriation (Ammon *et al.*, 2000; Lyakh *et al.*, 2002) oder positive Selektion mit magnetisch selektierbaren Antikörpern gegen den Oberflächenmarker CD14 isoliert (Luft *et al.*, 2002). Die hier verwendete Elutriation der Monozyten aus angereicherten MNC ist deshalb vorteilhaft, weil die Monozyten durch den Selektionsprozess unbeeinträchtigt bleiben und gleichzeitig große Monozytenmengen mit hoher Reinheit gewonnen werden können. Nach dem Testen verschiedener Medien wurde das serumfreie Medium „CellGro[®] DC“ (CellGenix) zur Generierung der DC verwendet. Medien mit Zusatz von xenologen Serumpräparationen (insbesondere FCS) bergen das Risiko, dass xenogene Proteine von den DC als Antigen präsentiert werden (Scheinecker *et al.*, 1998; Jonuleit *et al.*, 2001a). Serumfreie Medien anderer Anbieter (z. B. X-Vivo 15, Bio Whittaker) haben den Nachteil, dass zur optimalen DC-Differenzierung meist noch 1-2% autologes Plasma zugesetzt werden muss. Weil darin Substanzen wie Zytokine, Hormone oder sogar Medikamente enthalten sein können, besteht bei der Verwendung dieser Medien die potenzielle Gefahr einer Beeinflussung der Differenzierung durch nicht kalkulierbare Plasmakomponenten (Piemonti *et al.*, 1999; Penna & Adorini, 2000).

Die während der durchgeführten Versuchsreihen beobachteten Schwankungen bei der *in vitro* Differenzierung der DC waren somit abhängig vom Spender und nicht auf die Kulturbedingungen zurückzuführen. Prinzipiell ist jedoch anzumerken, dass im Vergleich zu DC, die aus Mauszellen generiert wurden, die *in vitro* Generierung humaner DC partiell durch die vom Spender abhängige genetische und individuelle Variabilität beeinflusst wird.

IV.1.2 Reifung dendritischer Zellen

Die Ausreifung von DC ist essentiell für eine effektive Antigenpräsentation zur Initiierung einer Immunantwort (Yoshimura *et al.*, 2001). Experimentell kann die DC-Reifung mit LPS (Palucka *et al.*, 1998), mit CD40-Ligand (CD40L; Vidalain *et al.*, 2001; O'Sullivan & Thomas, 2002), durch Verwendung eines von Monozyten konditionierten Mediums (MCM; Reddy *et al.*, 1997) oder durch Zugabe von TNF- α zum Kulturmedium erreicht werden (Übersicht bei Banchereau *et al.*, 2000). Vergleichende Studien von Jonuleit *et al.* (1997) zur Reifung von DC zeigen jedoch, dass eine Mischung aus den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β , IL-6 und TNF- α sowie PGE₂ optimal zur Induktion eines reifen DC-Phänotyps ist. Dieser „Cocktail“ simuliert die Reifung der DC mit MCM und hat den Vorteil, dass die entstehende DC-Population sehr homogen ist (Schuler *et al.*, 2003). Die so behandelten DC stimulieren die Proliferation von T-Zellen in einer allogenen MLR, wobei eine durch die Produktion von IL-2 und INF- γ gekennzeichnete T_H1-Antwort induziert wird. Zudem demonstrierten Jonuleit *et al.* (1997), dass der Zusatz von PGE₂ die Migrationsfähigkeit der DC erhöht.

Vergleichende *in vitro* Studien ergaben, dass mit verschiedenen Stimuli gereifte DC nur in Anwesenheit von PGE₂ nennenswerte migratorische Fähigkeiten aufweisen (Luft *et al.*, 2002; Scandella *et al.*, 2002), was für eine potenzielle klinische Anwendung von besonderer Bedeutung ist. Dabei zeigen mit LPS oder CD40L behandelte DC eine deutlich schlechtere Migrationsfähigkeit als die mit dem „Cocktail“ aus proinflammatorischen Zytokinen und PGE₂ gereiften DC, was auf eine verstärkte Expression des Chemokinrezeptors CCR7 zurückgeführt werden kann. Die migratorischen Eigenschaften von unreifen DC hingegen sind minimal (Hollender *et al.*, 2002). Prostaglandine zeigen allgemein eine reifungsinduzierende Wirkung auf unreife DC, wobei PGE₂ in Verbindung mit IL-1 β , TNF- α und IL-6 in dieser Hinsicht das potenteste Prostaglandin ist (Steinbrink *et al.*, 2000). Die mit diesen proinflammatorischen Molekülen ausdifferenzierten DC finden inzwischen auch in zahlreichen klinischen Studien Anwendung (Banchereau *et al.*, 2001; Jonuleit *et al.*, 2001a; Berger *et al.*, 2002; Schuler *et al.*, 2003).

Übereinstimmend mit den zuvor erwähnten Publikationen konnte bei den hier verwendeten mDC im Vergleich zu den iDC eine verstärkte Expression der kostimulatorischen Moleküle B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) sowie des MHC-Klasse-II-Moleküls HLA-DR beobachtet werden. Auch die Expression des Reifungsmarkers CD83 konnte auf mDC, jedoch nicht auf

iDC, detektiert werden (Kruse *et al.*, 2001). Um den Einsatz definierter DC-Populationen zu gewährleisten, wurden in den hier vorgelegten Untersuchungen alle *in vitro* differenzierten DC vor der Verwendung durchflusszytometrisch phänotypisiert. Durch die Verwendung von IL-1 β , IL-6, TNF- α und PGE₂ konnte bei unreifen DC aller untersuchten Spender zuverlässig eine Reifung induziert werden.

IV.1.3 Adenovirale Transduktion humaner DC

Vergleichende Studien zur genetischen Manipulation humaner DC mit verschiedenen Vektoren wie RNA, Plasmiden oder viralen Vektoren zeigen, dass ein effizienter Gentransfer in DC nur schlecht zu erzielen ist (Arthur *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu DC, die aus CD34⁺ Knochenmarkszellen generiert werden, findet bei DC, die aus Monozyten differenziert werden, keine Zellteilung mehr statt. Deshalb sind retrovirale Vektoren für die Transduktion dieser Zellen nicht geeignet (Lundqvist *et al.*, 2002a). Eine Ausnahme bilden jedoch lentivirale Vektoren, mit denen erfolgreich humane, aus Monozyten differenzierte DC transduziert werden können (Dyall *et al.*, 2001). Die besten Transduktionseffizienzen bei humanen, aus Monozyten generierten DC werden jedoch durch die Verwendung adenoviraler Vektoren erreicht (Dietz & Vuk Pavlovic, 1998), wobei unreife DC mit höherer Effizienz transduziert werden als reife DC. Dies ist auf eine stärkere Expression der Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ auf der Zelloberfläche unreifer DC zurückzuführen. Den DC fehlt zwar der für die Virusadsorption wichtige Cocksackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR; Bergelson *et al.*, 1997; Tillman *et al.*, 1999; Rebel *et al.*, 2000), jedoch exprimieren vor allem unreife DC die für die Internalisierung der Adenoviren verantwortlichen Integrine (Huang *et al.*, 1995; Hidaka *et al.*, 1999; Nemerow & Stewart, 1999; Rea *et al.*, 1999). Verbesserte Transduktionseffizienzen erreichten Tillman *et al.* (1999) durch einen gerichteten adenoviralen Gentransfer. Das verwendete Adenovirus trägt hierbei CD40L als Hüllprotein, woraus eine vermehrte Bindung an den für DC charakteristischen Oberflächenmarker CD40 und eine optimierte Internalisierung resultiert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl iDC als auch mDC mit adenoviralen Vektoren effektiv transduziert werden können. Die Transduktion mit AdEGFP induzierte keine Reifung in den iDC, was sowohl durch die Charakterisierung des Phänotyps als auch durch die funktionelle Analyse im Proliferationstest mit allogenen T-Lymphozyten bestätigt wurde. Auch mDC konnten sehr effizient mit AdEGFP

(mDC-EGFP) transduziert werden. Die mDC-EGFP zeigten gegenüber unbehandelten mDC keine Änderung in der Expression der untersuchten Oberflächenmarker und stimulierten T-Zellen in der allogenen MLR genauso stark wie die unbehandelten mDC. Auch die Transduktion von mDC mit AxCANCre und AdloxPFasL zur Expression von FasL führte zu keiner relevanten Veränderung des reifen DC-Phänotyps.

Im Hinblick auf eine Reifungsinduktion bei DC durch die adenovirale Transduktion finden sich kontroverse Ergebnisse. Während nur in einer Arbeit von Jonuleit *et al.* (2000b) beschrieben wird, dass eine Transduktion mit Adenoviren keine Reifung bei unreifen DC auslöst, konnte in anderen Untersuchungen eine Reifung unreifer DC nach adenoviraler Transduktion mit verschiedenen Reifungsstimuli beobachtet werden (Dietz & Vuk Pavlovic, 1998; Rea *et al.*, 1999; Zhong *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu kann nach Infektion mit HSV keine nachträgliche Reifung der humanen DC induziert werden (Jenne *et al.*, 2001). Der überwiegende Teil der veröffentlichten Studien verzeichnet jedoch eine Reifungsinduktion bei unreifen DC durch die Transduktion mit adenoviralen Vektoren (Rouard *et al.*, 2000; Lundqvist *et al.*, 2002a; Lyakh *et al.*, 2002).

Die kontroversen Ergebnisse in Bezug auf die Reifung der DC nach adenoviraler Transduktion könnten insbesondere auf die Viruspräparation zurückzuführen sein. Bei dieser kann es zu Verunreinigungen mit bakteriellen Produkten wie z. B. LPS kommen, die dann eine Reifung der DC induzieren können (Hartmann *et al.*, 1999; Ishii *et al.*, 2001; Kadowaki *et al.*, 2001). Da in den durchgeführten Untersuchungen keine Reifung der DC nach Transduktion mit den adenoviralen Vektoren festgestellt wurde, waren die verwendeten Adenoviruspräparationen demnach frei von solchen Kontaminationen.

IV.2 Generierung FasL-exprimierender DC

IV.2.1 FasL-exprimierende APC

Die bisher publizierten Studien mit FasL-exprimierenden APC wurden ausschließlich mit Zelllinien oder in Nagetiermodellen durchgeführt. Dabei werden meistens Zellen von Tieren eingesetzt, die eine Mutation des Fas-Moleküls oder des Fas-Signalweges aufweisen oder aus anderen Gründen gegenüber Fas-vermittelter Apoptose resistent sind. So können in diesen Untersuchungen Effektorzellen eingesetzt werden, die durch FasL-Expression nicht selbst ausgeschaltet werden.

Wu *et al.* (2001) benutzten ein Vacciniavirus zur FasL-Expression, das gleichzeitig eine trunkierte Form der *Fas-associated death domain* (FADD) trug, so dass die transduzierten APC vor Fas-vermittelter Selbstzerstörung geschützt waren. Eine ähnliche Strategie verfolgten Kosiewicz *et al.* (2002), indem sie die Fas-sensitive Zelllinie A20 (B-Zelllymphom der Maus) mit einem FADD dominant-negativen Konstrukt stabil transfizierten. Diese Zellen wurden dann mit einem FasL-tragenden Plasmid infiziert und konnten als APC-FasL *in vivo* genutzt werden. Die Arbeitsgruppe um Takashima verwendete für ihre Untersuchungen eine Maus-DC-Zelllinie mit reifem Phänotyp, die wenig Fas auf der Oberfläche exprimiert. Diese Zelllinie wurde zur FasL-Expression stabil mit Plasmiden transfiziert und für *in vivo* Studien eingesetzt (Matsue *et al.*, 1999; Matsue *et al.*, 2001; Kusuhara *et al.*, 2002; Wolfe *et al.*, 2002).

FasL-tragende Zellen können allerdings auch durch das „Dekorieren“ mit Streptavidin-FasL Biotin-markierter Milzzellen generiert werden (Yolcu *et al.*, 2002; Askenasy *et al.*, 2003). Bisher wurden auf diese Weise allerdings noch keine DC mit FasL „dekoriert“. Der Nachteil dieser Methode liegt darin, dass nach dem Verlust des Streptavidin-FasL Konjugats keine Neusynthese erfolgt und damit die Funktion verloren geht.

Eine relativ einfache Möglichkeit, FasL-exprimierende APC zu erhalten, ist die Verwendung von APC aus Fas-defizienten (*lpr/lpr*) Tieren (DC: Min *et al.*, 2000; Buonocore *et al.*, 2002; Buonocore *et al.*, 2003; Makrophagen: Zhang *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000). Auf Grund der Mutation im Fas-Rezeptor können diese APC FasL exprimieren, ohne gleichzeitig selbst durch Fas-vermittelte Apoptose eliminiert zu werden. Im Hinblick auf eine individuelle Immuntherapie T-zellabhängiger Erkrankungen beim Menschen ist der Einsatz solcher Fas-defizienten Zellen jedoch nicht durchführbar.

Wie oben ausgeführt, sind die meisten Strategien zur Herstellung von FasL-exprimierenden „Killer-APC“ komplex und für eine potenzielle therapeutische Anwendung bei Patienten nicht einsetzbar. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass eine FasL-Expression in primären humanen mDC durch adenoviralen Gentransfer induziert werden kann. Im Vergleich zu den im Tiermodell durchgeführten Studien ist diese Methode einfach in der Handhabung. Die Untersuchungen wurden mit DC von insgesamt 26 männlichen und weiblichen gesunden Spendern durchgeführt und die Ergebnisse waren reproduzierbar.

IV.2.2 Transduktion von humanen DC mit FasL unter Einsatz des Cre/loxP-Systems

Um eine induzierbare FasL-Expression zu gewährleisten, wurde das Cre/loxP-System verwendet (Zhang *et al.*, 1999). Nur unter Verwendung der beiden adenoviralen Vektoren AxCANCre und AdloxPFasL war es möglich, das FasL-Gen in der Fas⁺ Vermehrungszelllinie HEK 293 zu exprimieren (Larregina *et al.*, 1998; Watzlik *et al.*, 2000). Dabei birgt dieses System aber auch eine Schwierigkeit: Beide Vektoren müssen gleichzeitig in eine Zelle eindringen, damit es zu einer erfolgreichen FasL-Expression kommt. Bei der Expression von EGFP (Einzeltransduktion mit AdEGFP) konnten sehr hohe Transduktionseffizienzen bei DC erreicht werden (abhängig vom Spender zwischen 65-95%). Im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen (Jenne *et al.*, 2001), konnten mit der hier eingesetzten Methode nach Gahn *et al.* (2001) auch mDC mit hoher Effizienz transduziert werden. Auf Grund der zur FasL-Expression notwendigen Doppeltransduktion war die Effizienz bei Verwendung des Cre/loxP-Systems im Vergleich zur EGFP-Expression jedoch deutlich geringer. Die DC-FasL bildeten in der durchflusszytometrischen Analyse in Hinblick auf die FasL-Expression keine distinkte sondern eine kontinuierliche Population (abhängig vom Spender zwischen 30-80% FasL⁺ DC). Dies ist wahrscheinlich auf eine ständige Prozessierung des membranständigen FasL durch Metalloproteinasen (Kayagaki *et al.*, 1995) und die andauernde Neusynthese zurückzuführen.

IV.2.3 FasL-exprimierende humane dendritische Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass humane reife DC nach adenoviralem Gentransfer FasL exprimieren können, ohne an Fas-vermittelter Apoptose zu Grunde zu gehen. Die anfangs zur Transduktion verwendeten iDC konnten zwar schwach FasL exprimieren, wurden jedoch durch Fas-vermittelten Zelltod ausgeschaltet. Dies war nicht auf die Transduktion selbst zurückzuführen, da die mit AxCANCre oder AdloxPFasL einzeln transduzierten iDC keine erhöhten Apoptoseraten aufwiesen. Wurden dagegen reife DC für die Transduktion verwendet, waren die Apoptoseraten im Vergleich zu den einfach transduzierten oder unbehandelten mDC nur leicht erhöht. Der leicht erhöhte Anteil toter mDC nach Transduktion mit FasL dürfte am ehesten durch eine noch nicht vollständige Ausreifung dieser Zellen zum Zeitpunkt der Transduktion bedingt sein.

Übereinstimmend mit den hier präsentierten Ergebnissen zeigten verschiedene Arbeitsgruppen, dass bei unreifen DC durch Fas-Aktivierung Apoptose induziert werden kann (Koppi *et al.*, 1997; Leverkus *et al.*, 2000; Lundqvist *et al.*, 2002b). Sie stellten ebenfalls fest, dass eine Stimulation der Fas-vermittelten Apoptose nach Reifung der DC nur leicht erhöhte Apoptoseraten zur Folge hat. Der Schutz vor Fas-vermitteltem Zelltod bei mDC könnte durch die verstärkte Expression antiapoptotischer Moleküle vermittelt sein (Tschopp *et al.*, 1998; Opferman & Korsmeyer, 2003). Während der Reifung von humanen DC wurden im Vergleich zu unreifen DC größere Mengen der antiapoptotischen Moleküle c-FLIP (Leverkus *et al.*, 2000; Willems *et al.*, 2000; Nicolo *et al.*, 2001), Bcl-x_L und Bcl-2 beobachtet (Biswas *et al.*, 2001; Lundqvist *et al.*, 2002b). Lundqvist *et al.* (2002a) demonstrierten, dass aus humanen Monozyten generierte DC nach adenoviraler Transduktion vermehrt Bcl-2 und Bcl-x_L exprimieren und somit vor spontaner und Fas-vermittelter Apoptose geschützt sind. Dieses Ergebnis könnte aber durch den reifungsinduzierenden adenoviralen Gentransfer verursacht sein.

Adenovirale Proteine der E3-Region können außerdem selbst eine Unempfindlichkeit gegenüber Fas-vermittelter Apoptose durch Internalisierung von Fas (Shisler *et al.*, 1997) oder durch Inhibierung von Caspase-8 induzieren (Chen *et al.*, 1998). Dieser zur Etablierung einer persistierenden Adenovirusinfektion dienende Mechanismus scheint aber zumindest bei der Transduktion von iDC mit FasL keine Rolle zu spielen.

IV.2.4 Speziesübergreifender Einsatz von Maus-FasL bei humanen Zellen

Maus- und humaner FasL weisen eine Sequenzhomologie von 76,9% auf (Nagata & Golstein, 1995; Newell & Desbarats, 1999). Obwohl sich FasL von Maus und Mensch mit Hilfe von Antikörpern gegen das jeweilige Molekül deutlich unterscheiden lassen, werden die signalübertragenden Bereiche als austauschbar beschrieben (Nagata, 1997). Auch die hier vorgestellten Daten zeigen, dass FasL speziesübergreifend eingesetzt werden kann. Humane iDC wurden nach Transduktion mit dem Maus-FasL-Gen durch Apoptose ausgeschaltet. Weiterhin konnte durch den Maus-FasL sowohl bei der humanen T-Zelllinie Jurkat als auch bei aktivierten, primären humanen T-Lymphozyten Zelltod induziert werden. Aus der Literatur sind zahlreiche Beispiele bekannt, bei denen FasL erfolgreich speziesübergreifend eingesetzt wurde (Suda *et al.*, 1997; Schneider *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 1998; Min *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002a). Der Einsatz von Maus-FasL bei Patienten könnte jedoch trotz der

relativ hohen Homologie zu einer Immunreaktion gegen das Fremdprotein führen (Brown & Lillicrap, 2002). So wurde bei therapeutischen Anwendung des chimären anti-TNF-Antikörpers Infliximab die Bildung von körpereigenen Antikörpern beschrieben, die zur Inaktivierung dieses antiinflammatorischen Medikaments führten (Baert *et al.*, 2003).

Obwohl der Maus-FasL effizient humane T-Lymphozyten eliminieren kann, sollte für weitere Untersuchungen ein Vektorkonstrukt mit einem humanen FasL eingesetzt werden. Dann könnte zwar nicht mehr zwischen endogener und transgener Expression unterschieden werden, jedoch wären die Risiken, die ein solcher speziesübergreifender Einsatz mit sich bringt, damit vermindert.

IV.3 Funktionalität FasL-exprimierender mDC

IV.3.1 Eliminierung von Jurkat T-Zellen

Erste Untersuchungen zur Funktionalität der mDC-FasL wurden mit Jurkat T-Zellen durchgeführt. Diese humane Lymphomzelllinie ist besonders sensitiv für Fas-vermittelte Apoptose. Durch den agonistischen anti-Fas-Antikörper CH11 kann in Jurkat T-Zellen Apoptose ausgelöst werden, charakterisiert durch typische morphologische und biochemische Ereignisse wie „blebbing“ der Plasmamembran, Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung (Weis *et al.*, 1995). Daher wurde dieser Zellklon in der vorliegenden Arbeit als Positivkontrolle für die Apoptoseinduktion durch mDC-FasL verwendet. In zahlreichen veröffentlichten Studien wurde die humane Jurkat T-Zelllinie bereits als Indikator für eine erfolgreiche Apoptoseinduktion durch Maus-APC-FasL eingesetzt (Matsue *et al.*, 1999; Min *et al.*, 2000; Matsue *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002b; Whartenby *et al.*, 2002). Andere Arbeitsgruppen benutzten dagegen die Fas-exprimierende Maus-B-Zelllinie A20 als Targetzellen (Zhang *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2001; Kosiewicz *et al.*, 2002).

Im Vergleich zu anderen publizierten Ergebnissen zur Apoptoseinduktion durch APC-FasL waren die hier dargestellten mDC-FasL besonders effizient. **Tab. 4** fasst die aus der Literatur bekannten Apoptoseraten mit dem jeweils höchsten angegebenen E:T-Verhältnis zusammen. Die hier generierten mDC-FasL waren in der Lage, bei einem E:T-Verhältnis von 1:1 nach einer fünfstündigen Kokultur bei ca. 84% der Targetzellen Apoptose zu induzieren, was deutlich über den meisten publizierten Ergebnissen der Untersuchungen mit Maus-APC-FasL

liegt. Diese hohen Apoptoseraten wurden durch die Anwendung verschiedener Nachweismethoden bestätigt. Wurden mehr mDC-FasL pro Targetzelle eingesetzt, konnte der Anteil der apoptotischen Zellen nicht wesentlich gesteigert werden (E:T-Verhältnis von 5:1 mit 87% apoptotischen Zellen). Diese sehr hohen Apoptoseraten zeigen, wie effektiv die mDC-FasL bei der Induktion von Apoptose sind. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass es sich hierbei um *in vitro* Analysen handelt.

Tab. 4: Literaturdaten zur Apoptoseinduktion durch APC-FasL. Publikationen zu FasL-exprimierenden APC, in denen die Funktionalität dieser Zellen durch einen Zytotoxizitätstest (JAM-Test oder durchflusszytometrische Analyse) beschrieben wird. Dargestellt ist das jeweils höchste, angegebene E:T-Verhältnis.

Referenz	FasL-exprimierende APC	Targetzellen	E:T-Verhältnis	spezifische Lyse
(Buonocore <i>et al.</i> , 2003)	DC, Maus ^{lpr/lpr}	Jurkat	1:1	60%
(Kim <i>et al.</i> , 2002b)	DC, Maus	Jurkat	20:1	30%
(Kusuhara <i>et al.</i> , 2002)	Killer-DC-DC-Hybride, Maus	Jurkat		
	a) ohne Antigen		1:1	a) 35%
	b) mit Antigen			b) 80%
(Matsue <i>et al.</i> , 1999)	XS106 DC-Zelllinie, Maus	Jurkat		
	a) ohne Antigen		1:1	a) 35%
	b) mit Antigen			b) 80%
(Matsue <i>et al.</i> , 2001)	Killer-DC-DC-Hybride, Maus	Jurkat	1:1	40%
(Min <i>et al.</i> , 2000)	DC, Maus ^{lpr/lpr}	Jurkat	100:1	60%
(Whartenby <i>et al.</i> , 2002)	DC, Maus ^{lpr/lpr}	Jurkat	1:1,25	42%
(Wu <i>et al.</i> , 2001)	MC57G Fibroblasten, Maus	A20	9:1	60%
(Zhang <i>et al.</i> , 1998):	Makrophagen, Maus ^{lpr/lpr}	A20	10:1	85%
(Zhang <i>et al.</i> , 1999)	Makrophagen, Maus ^{lpr/lpr}	A20	20:1	70%

Die Apoptoseinduktion durch mDC-FasL in Jurkat T-Zellen konnte durch Zugabe des blockierenden anti-Maus-FasL-Antikörpers Kay-10 (Kayagaki *et al.*, 1997) unterbunden werden. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass für die Apoptoseinduktion die Interaktion von FasL auf den transduzierten DC mit Fas auf der Oberfläche der Jurkat T-Zellen notwendig ist. Auch Matsue *et al.* (1999) setzten diesen Antikörper erfolgreich zur Blockierung der FasL-induzierten Apoptose durch ihre „Killer-DC“ in einem Mausmodell ein.

IV.3.2 Eliminierung primärer humaner T-Lymphozyten

Im Gegensatz zu Jurkat T-Zellen werden primäre humane T-Lymphozyten erst nach Aktivierung für die Fas-vermittelte Apoptose empfänglich (Scaffidi *et al.*, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb die ersten Kokultivierungsexperimente mit polyklonal aktivierten T-Lymphozyten durchgeführt. Hierfür wurde eine Stimulation mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern in Kombination mit dem Zytokin IL-2 gewählt, was eine Aktivierung mit einem Antigen durch eine APC simuliert. Auf eine Eliminierung antigenspezifischer T-Lymphozyten wurde zunächst verzichtet, um mit möglichst geringem technischen Aufwand die Funktionalität der mDC-FasL in Kokulturen mit primären humanen T-Lymphozyten analysieren zu können.

Zunächst wurden T-Zellfraktionen aus der Elutriation polyklonal aktiviert und die Proliferation der T-Lymphozyten untersucht. Die Kokultur mit mDC-FasL führte zu einer deutlich verminderten Proliferation aktivierter T-Zellen. Eine Annexin V-FITC/PI-Färbung der T-Lymphozyten zeigte, dass dies auf Apoptoseinduktion zurückzuführen war. Im Gegensatz dazu konnten mDC-FasL bei ruhenden T-Lymphozyten in den kurz andauernden Kokulturen weder die Proliferation beeinflussen, noch konnten erhöhte Apoptoseraten im Vergleich zu den Kontrollkulturen festgestellt werden. Experimente mit dem blockierenden anti-Maus-FasL-Antikörper Kay-10 (Kayagaki *et al.*, 1997) zeigten, dass die Apoptoseinduktion durch mDC-FasL auch bei primären humanen T-Lymphozyten auf die Fas-FasL-Interaktion zurückzuführen war. Durch Zusatz dieses Antikörpers konnte in den Kokulturen mit mDC-FasL Proliferation bei den aktivierten T-Zellen ausgelöst werden. Im Gegensatz dazu konnte bei Verwendung der Isotypkontrolle oder in Kokulturen mit mDC-FasL ohne einen Antikörper eine deutliche Inhibierung der T-Zellproliferation festgestellt werden. Auch Lu *et al.* (1997) konnten bei Blockierung von FasL durch ein Fas-Fc-Fusionsprotein eine Induktion von Proliferation bei den Responderzellen durch FasL⁺ APC als Stimulatorzellen erzielen.

Bei der Untersuchung einzelner Aktivierungsmarker der T-Zellsubpopulationen zeigte sich in Übereinstimmung mit publizierten Ergebnissen nur eine geringe Fas-Expression bei ruhenden T-Lymphozyten, was die beobachtete Apoptoseresistenz erklärt (Algeciras-Schimnich *et al.*, 1999; Schmitz *et al.*, 2003). Der Umkehrschluss, eine starke Fas-Expression auf der Zelloberfläche von Lymphozyten führe zu einer hohen Apoptosesensitivität, ist allerdings nicht gültig. Bei humanen T-Lymphozyten kann erst 5 Tage nach Initiierung einer allogenen

MLR Fas-vermittelte Apoptose ausgelöst werden, da die Lymphozyten bis dahin auf Grund erhöhter Expression von antiapoptotischen Molekülen wie c-FLIP und Bcl-2 geschützt sind (O'Flaherty *et al.*, 2000). Schmitz *et al.* (2003) stellten fest, dass frisch isolierte, humane T-Lymphozyten auch große Mengen des antiapoptotischen Moleküls Bcl-x_L exprimieren und somit trotz Fas-Expression nicht sensitiv für FasL-induzierte Apoptose sind. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Fas-vermittelte Apoptose auf verschiedenen Ebenen reguliert wird.

Die Stimulation mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern sowie mit IL-2 über 6 Tage führte zu einer starken T-Zellaktivierung. Diese konnte bei CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten mittels durchflusszytometrischer Analyse der verstärkt exprimierten Oberflächenantigene CD25, CD69 und Fas festgestellt werden. Jede der drei verwendeten Stimulationskomponenten ist an der T-Zellaktivierung beteiligt. Die Stimulation des TCR durch anti-CD3-Antikörper erhöhe die Sensitivität der T-Lymphozyten für die Fas-vermittelte Apoptose (Wong *et al.*, 1997; Li-Weber *et al.*, 1998; Kirchhoff *et al.*, 2002). Nur bei Stimulation sowohl über den TCR als auch durch Kostimulation über den CD28-Rezeptor kommt es zu einer vollständigen Aktivierung der T-Lymphozyten. Verschiedene Arbeitsgruppen demonstrierten, dass die Aktivierung des CD28-Rezeptors wie ein Überlebenssignal wirkt und die so stimulierten T-Zellen vor Fas-vermittelter Apoptose geschützt sind (Radvanyi *et al.*, 1996; Daniel *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1997). Jedoch zeigten Collette *et al.* (1998), dass eine alleinige Stimulation mit anti-CD28 eine FasL-Expression induzieren kann, die zur Apoptoseinduktion in T-Lymphozyten führt. Die CD28-Stimulation der T-Lymphozyten führte zunächst zu einer Produktion von IL-2, begleitet von einer protektiven, verstärkten Expression von Bcl-x_L (Boise *et al.*, 1995). Bei längerer Exposition sensibilisiert IL-2 jedoch T-Lymphozyten für die Fas-vermittelte Apoptose (Esser *et al.*, 1997; Van Parijs *et al.*, 1999). Das Zytokin IL-2 dient also in der frühen Aktivierungsphase als Wachstumsfaktor und Überlebenssignal für T-Zellen, während es in der Spätphase der Immunantwort apoptosesensibilisierend wirkt. So entwickeln Mäuse mit einer Defizienz für den IL-2-Rezeptor eine Autoimmunerkrankung, die auf einer Störung in der T-Zellapoptose beruht (Van Parijs *et al.*, 1999; Schimpl *et al.*, 2002).

Erst die Vorstimulation machte die primären humanen T-Lymphozyten empfänglich für das Apoptosesignal durch mDC-FasL. Die hier beschriebenen Experimente zeigten aber, dass selbst 48 Stunden nach Initiierung der Kokultur mit mDC-FasL nicht alle der aktivierten T-Lymphozyten eliminiert wurden. Die durchflusszytometrischen Analysen der

Annexin V-FITC/PI-Färbung zeigten, dass 51% der CD4⁺ T-Zellen und 43% der CD8⁺ T-Zellen die Kokultur mit mDC-FasL überlebten.

Möglicherweise wurden diese überlebenden T-Lymphozyten nicht oder noch nicht ausreichend aktiviert (Scaffidi *et al.*, 1999). Die nicht vorhandene Apoptosesensitivität könnte aber auch durch eine primäre Apoptoseresistenz begründet sein. Die Resistenz gegenüber Fas-vermittelter Apoptose nach Aktivierung wird von vielen Arbeitsgruppen für eine Subpopulation von T-Lymphozyten beschrieben. Strauss *et al.* (2003) zeigten, dass die Langzeitaktivierung von spezifischen T-Zellen (achtmalige, wöchentliche Restimulation der T-Zellen mit einem spezifischen Antigen) zu einer Resistenz gegenüber Fas-induzierter Apoptose führt. Auf Grund der kurzen, einmaligen Aktivierung der T-Lymphozyten in dem hier verwendeten System, kann aber eine solche Resistenz, ausgelöst durch repetitive Stimulation, ausgeschlossen werden. Inaba *et al.* (1999) stellten fest, dass Gedächtniszellen nach Stimulation mit einem Antigen zwar Fas auf der Zelloberfläche exprimieren, aber gegenüber Fas-vermittelter Apoptose durch verstärkte Expression antiapoptotischer Moleküle geschützt sind. Weitere Untersuchungen zeigten, dass überlebende CD4⁺ T-Lymphozyten (Varadhachary *et al.*, 1997) sowie CD8⁺ T-Lymphozyten (Zhang *et al.*, 1996) einen T_H2-Phänotyp aufweisen.

Dass einige T-Lymphozyten die Interaktion von Fas mit FasL überleben, ist jedoch nicht verwunderlich, wenn man die physiologische Bedeutung berücksichtigt: Bei der Aufrechterhaltung der Homöostase durch AICD über Fas-FasL-Interaktion sollen nicht mehr benötigte, aktivierte T-Zellen eliminiert werden. AICD wird fast ausschließlich durch Fas-FasL-Interaktion vermittelt, da durch Zugabe blockierender Antikörper gegen Fas oder FasL AICD nahezu komplett unterbunden werden kann (Alderson *et al.*, 1995; Dhein *et al.*, 1995; Ju *et al.*, 1995). Trotzdem müssen im Laufe einer normalen Immunantwort einige T-Zellen nach Eliminierung des Antigens als Gedächtniszellen überleben, um bei einem erneuten Kontakt mit dem Antigen schnell und effektiv eine spezifische T-Zellantwort initiieren zu können. Würden sämtliche aktivierten T-Lymphozyten durch AICD ausgeschaltet, würden zunehmend Lücken im T-Zellrepertoire auftreten. Einige T-Zellen müssen also einen Mechanismus besitzen, der vor Fas-induzierter Apoptose in einem Milieu FasL-exprimierender Zellen schützt.

In weiterführenden Experimenten sollte daher geklärt werden, welche T-Lymphozyten die Apoptoseinduktion durch mDC-FasL überleben. Zunächst muss dafür eine phänotypische

Charakterisierung der verbleibenden T-Lymphozyten nach Kokultur mit mDC-FasL durchgeführt werden. Ein geeigneter Marker hierfür ist u. a. CD45RO, der auf Gedächtniszellen exprimiert wird. Weiterhin könnten auch Unterschiede in der Intensität der Fas-Expression auf diesen Zellen auftreten. Die Bestimmung des Zytokinprofils der apoptoseresistenten T-Lymphozyten würde Aufschluss darüber geben, ob diese Zellen einen T_H1- oder T_H2-Antworttyp vermitteln. Würden ausschließlich naive T-Lymphozyten oder Gedächtniszellen zur polyklonalen Voraktivierung eingesetzt, könnten darüber hinaus Anhaltspunkte über die Eigenschaften der apoptoseresistenten T-Zellen gewonnen werden. Zudem könnte die Analyse der Expression antiapoptotischer Moleküle in den Zellen auch Hinweise auf den Mechanismus der Apoptoseresistenz geben.

IV.3.3 Rolle des löslichen FasL bei der Apoptoseinduktion

Blockierungsexperimente mit spezifischen Inhibitoren von Metalloproteinasen zeigten, dass membrangebundener FasL als sFasL freigesetzt wird (Kayagaki *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1996). Eine direkte Freisetzung von funktionell aktivem sFasL kann aber auch aus lysosomenähnlichen Kompartimenten erfolgen (Bossi & Griffiths, 1999; Martinez-Lorenzo *et al.*, 1999). Die Quantifizierung von sFasL in den Kulturüberständen adenoviral transduzierter DC ergab, dass nur nach gleichzeitiger Transduktion mit AxCANCre und AdloxPFasL der Maus-sFasL in großen Mengen prozessiert wird.

Die Rolle des sFasL bei der Apoptoseinduktion in dem hier verwendeten System wurde zunächst im JAM-Test untersucht. Unter Verwendung von Transwells konnte gezeigt werden, dass die FasL-induzierte Apoptose nur durch direkten Zellkontakt vermittelt wird. Als Positivkontrolle dienten Ansätze mit dem löslichen, agonistischen anti-Fas-Antikörper CH11. Dieser konnte durch die Transwellmembran in das Kompartiment mit den Targetzellen diffundieren und Zelltod auslösen. In Transwell-Ansätzen mit FasL-exprimierenden iDC und mDC konnte hingegen keine Apoptose detektiert werden. Daher wurde zunächst angenommen, dass die von DC-FasL induzierte Apoptose über einen Zellkontakt abhängigen Mechanismus verlief und sFasL keine Rolle spielte.

Weitere Untersuchungen wurden dann in Transferexperimenten mit konditioniertem Medium von mDC-FasL auf Jurkat T-Zellen oder primären humanen T-Lymphozyten durchgeführt. Steigende Mengen von konditioniertem Medium mit sFasL lösten bei den Jurkat T-Zellen dosisabhängig Apoptose aus. Ein deutlicher Anstieg der Apoptoseraten konnte allerdings erst

ab einem Zusatz von 20% konditioniertem Medium der mDC-FasL verzeichnet werden. Ein apoptoseinduzierender Effekt auf aktivierte primäre humane CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten durch sFasL-haltigen Überstand war jedoch nicht nachweisbar.

Die Mengen an freigesetzten sFasL in den Transwell-Experimenten des JAM-Tests während der fünfstündigen Inkubation waren wahrscheinlich zu gering, um bei den Jurkat T-Zellen Zelltod auslösen zu können. Größere Mengen von Maus-sFasL induzierten aber bei Jurkat T-Zellen Apoptose. Da selbst hohe Dosierungen konditionierten Mediums mit sFasL keine deutliche Auswirkung auf primäre humane T-Lymphozyten hatten, ist bei diesen der sFasL bei Betrachtung der Apoptoseinduktion zu vernachlässigen. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu dem der von Suda *et al.* (1997) durchgeführten Untersuchungen, nach denen Maus-sFasL im Gegensatz zu humanem sFasL bei humanen CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten Apoptose induzieren kann.

Weitere Publikationen weisen jedoch darauf hin, dass sFasL die durch membranständigen FasL-vermittelte Apoptose inhibieren kann (Cheng *et al.*, 1994; Kayagaki *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1996; Suda *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1998). Die Inhibierung von Metalloproteinasen erhöht die Menge an membranständigem FasL (Kayagaki *et al.*, 1995) und somit die Zytotoxizität der FasL-exprimierenden Zellen (Schneider *et al.*, 1998; Knox *et al.*, 2003). Daher ist ein potenziell inhibierender Effekt des Maus-sFasL in dem hier vorgestellten System nicht auszuschließen. Es sollten deshalb weitere Experimente mit mDC-FasL in Anwesenheit von Inhibitoren für Metalloproteinasen durchgeführt werden, um zu untersuchen, ob ein Teil der aktivierten T-Lymphozyten durch sFasL vor der Fas-vermittelten Apoptose geschützt werden kann.

Der Einsatz einer FasL-Form, die von den Zellen durch Metalloproteinasen in sFasL prozessierbar ist, scheint problematisch zu sein. Die direkte Injektion von FasL bzw. agonistischer anti-Fas-Antikörper induziert bei Mäusen letale Leberschäden (Ogasawara *et al.*, 1993) und löst auch *in vitro* bei humanen Hepatozyten Zelltod aus (Galle *et al.*, 1995). Der Einsatz von *ex vivo* manipulierten Zellen kann die Toxizität von FasL vermindern (Matsue *et al.*, 1999). Einige Arbeitsgruppen zeigten in allogenen Transplantationsmodellen, dass die Übertragung FasL-exprimierender Zellen oder Organen die Überlebensraten erhöht (Gainer *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998; Swenson *et al.*, 1998). Jedoch stellten andere Studien eine massive Infiltration von Neutrophilen in die allogenen, FasL-exprimierenden Transplantate fest, was zu deren Zerstörung führte (Allison *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 1997; Takeuchi *et al.*, 1999). Die Vermittlung des chemotaktischen Effekts auf neutrophile Granulozyten könnte

direkt oder indirekt durch FasL vermittelt sein. Durch Blockierung von FasL (Seino *et al.*, 1998) oder Fas (Ottonello *et al.*, 1999) bei Migrationstests mit humanen Neutrophilen reagieren diese nicht mehr chemotaktisch auf rekombinanten, humanen sFasL. Zudem zeigten Park *et al.* (2003), dass Neutrophile auch durch den agonistischen anti-Fas-Antikörper CH11 zur Migration angeregt werden. FasL induzierte allerdings in neutrophilen Granulozyten Apoptose (Chen *et al.*, 2003). Einen indirekten chemotaktischen Effekt von FasL auf Neutrophile beschrieben Hohlbaum *et al.* (2001) in einem Mausmodell. Dabei lösen FasL-tragende Mikrovesikel bei Peritonealmakrophagen die Sekretion der proinflammatorischen Moleküle MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2 (*macrophage inflammatory protein*) und IL-1 β aus, die chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirken. Zudem demonstrierten Gregory *et al.* (2002) unter Verwendung von Tumoren, die nicht prozessierbaren, nur membrangebunden FasL exprimierten, dass neutrophile Granulozyten eine Entzündungsreaktion auslösen und diese Tumoren abgestoßen werden.

Generell sind bei der Betrachtung von Publikationen über FasL und insbesondere sFasL die verschiedenen verwendeten Formen zu beachten. So werden rekombinante Proteine ebenso eingesetzt wie „natürlich“ prozessierte Formen. Je nach Spezies des FasL oder der FasL-exprimierenden Zellen kann das Transmembranprotein gänzlich unterschiedlich prozessiert werden (Schneider *et al.*, 1997).

Wie der lösliche und der membrangebundene FasL in dem hier vorgestellten System wirkt, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Es müssten Migrationsexperimente mit humanen Neutrophilen und konditionierten Überständen von mDC-FasL durchgeführt werden. Diese könnten dann aufzeigen, ob der Maus-sFasL auf menschliche Zellen direkt chemotaktisch wirkt. Eine Kokultur von mDC-FasL und neutrophilen Granulozyten könnte Aufschluss darüber geben, ob humane Neutrophile durch Maus-FasL-induzierten Zelltod eliminiert werden können.

Die Konstruktion und der Einsatz einer FasL-Form, die nicht mehr durch Metalloproteinasen prozessiert werden kann, sollte außerdem für weitere Untersuchungen in Betracht gezogen werden. Ein solches Konstrukt existiert bereits und wird *in vivo* bei Mäusen bereits eingesetzt (Gregory *et al.*, 2002). Dies würde einen möglichen inhibierenden Effekt von sFasL bei der Apoptoseinduktion durch membranständigen FasL sowie einen möglichen direkten chemotaktischen Effekt auf neutrophile Granulozyten mindern. Zudem könnte so die Zytotoxizität der mDC-FasL erhöht werden.

IV.3.4 Eliminierung allogen aktivierter T-Zellen

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die mDC-FasL auch alloreaktive T-Lymphozyten durch Apoptoseinduktion eliminieren können. Die Kokultur von mDC-FasL mit allogen aktivierten T-Lymphozyten hatte einen verminderten Einbau von ^3H -Methyl-Thymidin zur Folge. Dies konnte mit Hilfe durchflusszytometrischer Analysen von Annexin V-FITC/PI-Färbungen auf eine Apoptoseinduktion bei den alloreaktiven T-Lymphozyten zurückgeführt werden.

Zahlreiche Untersuchungen sind mit FasL-exprimierenden allogenen Transplantaten im Tiermodell durchgeführt worden. Dabei werden die Organtransplantate direkt adenoviral (Nieren: Swenson *et al.* 1998) oder mit Plasmiden (Leber: Li *et al.* 1998; pankreatische Inseln: Gainer *et al.*, 1998) transfiziert und in allogene Empfängertiere implantiert, was zu einer erhöhten Überlebensrate führt. Auch bei der Übertragung von Knochenmark in einem Mausmodell kann durch die Eliminierung alloreaktiver T-Zellen mit einem agonistischen anti-Fas-Antikörper vor der Transplantation alloantigenspezifisch Toleranz erreicht werden (Hartwig *et al.*, 2002). Zu einem vergleichbaren Ergebnis kommen Elhalel *et al.* (2003), die ein sogenanntes CTLA-4-FasL „Konverterprotein“ verwenden. Die Proliferation von humanen T-Lymphozyten in einer primären allogenen MLR kann in Anwesenheit von CTLA-4-FasL unterdrückt und auch durch wiederholte Stimulation in einer sekundären MLR nicht induziert werden.

Weitere Arbeiten beschäftigen sich mit tolerogenen DC bei der Induktion einer alloantigenen Toleranz, wobei auch FasL-exprimierende APC beschrieben werden (Hackstein *et al.*, 2001; Ichim *et al.*, 2003). Die Studien von Matsue *et al.* (2001) zeigten, dass die verwendeten „Killer-DC-DC-Hybriden“ *in vivo* alloantigenspezifische T-Lymphozyten eliminieren konnten. Der weitere Einsatz dieser „Killer-DC-DC-Hybriden“ verdeutlicht aber, dass diese APC-FasL nicht sehr effizient bei der Eliminierung antigenspezifischer T-Zellen sind, und dass die APC-FasL nur eine schlechte Homingeffizienz zu den Lymphknoten aufweisen (Kusuhara *et al.*, 2002). Dies kann durch die Verwendung einer Maus-DC-Zelllinie zur Generierung der „Killer-DC-DC-Hybriden“ verursacht sein. Unter Verwendung eines anderen allogenen Transplantationsmodells mit FasL-exprimierenden Maus-DC wurde allerdings eine starke alloantigenspezifische Aktivierung von T-Lymphozyten beschrieben (Buonocore *et al.*, 2002; Buonocore *et al.*, 2003). Die dort präsentierten Daten erlauben jedoch keine Aussage über die FasL-Expression der verwendeten DC oder den Einfluss von sFasL. Sehr

problematisch erscheint auch die Applikation der FasL-exprimierenden DC: Diese werden subkutan verabreicht und die Frage bleibt offen, ob die DC mit den T-Lymphozyten in Kontakt treten.

Im Rahmen der hier vorgelegten Ergebnisse sollten weitere Untersuchungen in dem allogenen Stimulationsmodell durchgeführt werden, um zu bestimmen, ob alle alloreaktiven T-Zellen durch die Kokultur mit mDC-FasL zerstört werden können. Dazu würde man die überlebenden T-Lymphozyten nach der Kokultur mit mDC-FasL retten und dann in einer weiteren Restimulation wiederum gegen DC des gleichen Spenders einsetzen. Es wird postuliert, dass dann auf Grund einer alloantigenspezifischen Toleranz keine Reaktivität gegen diese DC auftritt. Gegenüber DC eines dritten, irrelevanten DC-Spenders sollten diese T-Lymphozyten aber normal reagieren.

IV.4 Potenzielle therapeutische Anwendung von mDC-FasL bei T-zellabhängigen Erkrankungen

T-zellabhängige Erkrankungen wie Autoimmunerkrankungen oder Transplantat-Abstoßungsreaktionen werden in der Regel mit unspezifisch wirkenden Immunsuppressiva einfach oder in Kombination behandelt. Bei einer generellen Unterdrückung des Immunsystems können aber auch normalerweise leicht zu bekämpfende Infektionen (sogenannte opportunistische Infektionen) auftreten, die zum Teil schwerwiegende Folgen haben (Piemonti *et al.*, 1999; Mottram, 2003). Vorrangiges Ziel der hier vorgestellten Arbeit war die Etablierung eines Protokolls zur Generierung humaner APC-FasL von individuellen Spendern (hier mDC-FasL). Diese Zellen sollten auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, antigenspezifisch T-Lymphozyten zu eliminieren. Die APC sollten dabei die T-Zellen über der MHC-TCR-Interaktion und über kostimulatorische Signale vollständig aktivieren können. Gleichzeitig sollte aber mit der FasL-Expression auf den DC ein drittes, apoptoseinduzierendes Signal vermittelt werden. Ein Zusammentreffen von mDC-FasL und T-Zellen sollte dann ausschließlich zur Deletion von antigenspezifisch aktivierten T-Lymphozyten führen. T-Zellen, die das Antigen nicht erkennen, sollten dagegen vor dem Apoptosesignal geschützt sein und somit überleben.

Unter Berücksichtigung der gewonnenen Ergebnisse wird folgendes Konzept für eine potenzielle therapeutische Anwendung von mDC-FasL in der Klinik postuliert: Bei der

Therapie einer T-zellabhängigen Erkrankung mit mDC-FasL würden von dem betroffenen Patienten Monozyten gewonnen und diese *in vitro* zu DC differenziert werden. Nach Ausreifung mit den proinflammatorischen Molekülen IL-1 β , IL-6, TNF- α und PGE₂ würden diese mDC mit dem FasL-Gen transduziert werden. Anschließend würde die Beladung der mDC-FasL mit dem jeweils spezifischen Antigen für die Präsentation über MHC-Klasse-I- bzw. MHC-Klasse-II-Moleküle erfolgen. Voraussetzung dafür ist allerdings, dass für die diagnostizierte Erkrankung auch das entsprechende individuell relevante Autoantigen bekannt ist. Die beladenen mDC-FasL würden dann dem Patienten zurückgegeben. Die Administrationsroute der beladenen mDC-FasL könnte über intravenöse, subkutane oder intranodale Injektion erfolgen. Unklar ist jedoch, ob und wenn ja, wie häufig diese Behandlung wiederholt werden müsste, um durch die Eliminierung der relevanten T-Lymphozyten einen therapeutischen Effekt zu erzielen.

Dieses Konzept einer möglichen Therapie mit mDC-FasL beim Menschen beinhaltet aber kritische Schritte und wirft weiterführende Fragen auf.

Die direkte intravenöse Administration von Adenoviren führte 1999 bei einem Patienten innerhalb kürzester Zeit zu dessen Tod, hervorgerufen durch die starke Hepatotoxizität der Vektoren (St. George, 2003). Andere Strategien zum therapeutischen Einsatz von Adenoviren verfolgen eher indirekte Ansätze, bei denen Zellen *ex vivo* manipuliert und danach zur Behandlung *in vivo* eingesetzt werden (Vorburger & Hunt, 2002). Dieser *ex vivo* Ansatz wird auch in dem hier postulierten Konzept verfolgt. Verschiedene Arbeitsgruppen beschreiben allerdings Immunreaktionen auf adenovirale Antigene (Smith *et al.*, 1996; Molnar-Kimber *et al.*, 1998; Hegde *et al.*, 2003), die zu einer verkürzten Überlebenszeit der transduzierten Zellen *in vivo* führen. Auch die hier untersuchten mDC-FasL könnten nach der Transduktion adenovirale Proteine präsentieren. Würden diese mDC-FasL adenovirusspezifische T-Lymphozyten eliminieren, könnte eine künstliche Immundefizienz gegenüber Adenoviren hervorgerufen werden. Adenoviren könnten, wie von immundefizienten Patienten bekannt, schwere Infektionen beim behandelten Patienten verursachen. Ziel weiterer Experimente sollte daher die Etablierung einer Methode sein, die die Expression von FasL ohne adenovirale Vektoren ermöglicht. Dazu könnten Methoden wie z. B. die Nukleofektion von FasL-kodierender RNA oder Plasmiden verwendet werden.

Aus Studien mit DC-Vakzinen in der Tumorthherapie können erste Rückschlüsse auf die Beladung von mDC-FasL mit Antigenen gezogen werden. Die meisten Strategien

beschäftigen sich dabei mit der Aktivierung von tumorspezifischen CD8⁺ CTLs, während Studien mit CD4⁺ T-Helferzellen bisher selten durchgeführt werden (Svane *et al.*, 2003). Ein Merkmal der DC-Reifung ist der Verlust der phagozytotischen Aktivität (Lanzavecchia, 1996). Auf Grund der apoptoseinduzierenden Wirkung von FasL auf iDC müssten zur Transduktion aber mDC eingesetzt werden, die jedoch nur begrenzt oder nicht mehr zur Phagozytose fähig sind. Zur spezifischen Aktivierung von CD8⁺ CTL ist es ausreichend, reife DC mit Peptiden zu beladen, die über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert werden (Meidenbauer *et al.*, 2003). Zur Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen ist eine Präsentation über MHC-Klasse-II-Moleküle nötig, wobei das Antigen als ganzes Protein zur DC-Kultur kurz vor oder gleichzeitig mit den Reifungsstimulus gegeben werden kann (Schlienger *et al.*, 2000). Die Zugabe eines Proteinantigens zu den DC-Kulturen hat zudem den Vorteil, dass dieses sowohl Epitope für MHC-Klasse-I- als auch für MHC-Klasse-II-Moleküle beinhaltet (Shen *et al.*, 1997). Diese könnten von den DC prozessiert werden, was in der Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten resultiert.

Andere Arbeiten aus dem Bereich der Tumorummunologie beschäftigen sich mit dem Gentransfer spezifischer Antigene in DC zur Induktion antigenspezifischer T-Zellen (Kaplan *et al.*, 1999; Gahn *et al.*, 2001; Jenne *et al.*, 2001). Dabei werden die transduzierten Antigene über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert. Man erhält so eine proliferative Antwort von CTL jedoch keine der T-Helferzellen (Morrison *et al.*, 1986; Sweetser *et al.*, 1988). Der experimentelle Ansatz von Bonini *et al.* (2001) zeigt, dass der natürliche Weg der Antigenaufnahme, -prozessierung und -präsentation umgangen werden kann. Der verwendete Vacciniavirusvektor trägt ein spezifisches Antigen, an das eine LAMP1-Sequenz (*lysosomal associated membran protein-1*) angehängt ist. Das Antigen gelangt so in die Lysosomen und die Präsentation erfolgt sowohl über MHC-Klasse-II- als auch MHC-Klasse-I-Moleküle. Wegen der vielen verschiedenen relevanten Antigene bei Autoimmunkrankheiten oder bei Transplantationen erscheint die Herstellung und Kotransduktion von antigenkodierenden Vektoren aufwendig, jedoch prinzipiell durchführbar. Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung von Proteinen als Antigen im Vergleich zu kurzen Peptidsequenzen liegt in der individuellen Prozessierung durch DC: Die relevanten Peptide müssen für jeden HLA-Typ identifiziert und die DC damit beladen werden. Dagegen erfolgt die Prozessierung der Antigene und die Präsentation der entscheidenden Epitope bei der Verwendung gesamter Proteine automatisch durch die DC.

Neben der Frage der Beladung der mDC-FasL ist es aber vor allem wichtig, das Antigen zu spezifizieren. Nur bei wenigen Autoimmunkrankheiten sind die beteiligten Autoantigene bekannt (Schmitt, 2003). Ein beim Menschen häufig untersuchtes Autoantigen ist GAD65, die Glutaminsäuredecarboxylase von 65 kDa, die an der Entstehung des Diabetes Mellitus Typ I beteiligt ist (Lernmark, 2002). Im peripheren Blut von Patienten mit Diabetes Mellitus Typ I sind T-Zellen nachweisbar, die spezifisch auf GAD65 reagieren (Viglietta *et al.*, 2002). Ein weiteres gut untersuchtes Beispiel für ein pathogenetisch relevantes Autoantigen ist MBP (*myelin basic protein*), das bei der Entstehung der Multiplen Sklerose eine wichtige Rolle spielt (Meinl & Hohlfeld, 2002). Darüber hinaus werden zahlreiche Tiermodelle für Autoimmunkrankheiten beschrieben, die durch spezifische Antigene ausgelöst werden und auch für die entsprechenden Erkrankungen beim Menschen von besonderer Bedeutung sein können (Harrison & Hafler, 2000; Mocchi *et al.*, 2000; Boyton & Altmann, 2002). Diese definierten Autoantigene erscheinen als Kandidaten für einen potenziellen therapeutischen Einsatz geeignet, wobei die Relevanz zunächst *in vitro* durch geeignete Stimulationstests nachgewiesen werden muss.

Die Administrationsroute für mDC-FasL könnte allerdings auch entscheidend für den Erfolg einer potenziellen Therapie sein. Seit dem Einsatz von DC-Vakzinen in Tumortherapien werden an Patienten die verschiedenen Applikationswege untersucht (Svane *et al.*, 2003). Der Kontakt zwischen naiven T-Zellen und DC geschieht im Parakortex der Lymphknoten, danach wandern die aktivierten T-Effektorzellen zum Ort der Entzündung. Eine optimale Stimulation antigenspezifischer T-Lymphozyten hingegen kann durch wiederholte intranodale Injektion von antigenbeladenen, reifen DC erhalten werden (Jonuleit *et al.*, 2001a; Bedrosian *et al.*, 2003; Robert *et al.*, 2003). Die mDC-FasL müssten also im Idealfall am Ort der Entzündung präsent sein, um bereits aktivierte, Fas-sensitive T-Zellen zu eliminieren. Zur Deletion naiver antigenspezifischer T-Zellen müssen die DC dagegen in den Lymphknoten gelangen. In einem *in vivo* Mausmodell der rheumatoiden Arthritis zeigten Turner *et al.* (2002), dass intravenös injizierte, retroviral transduzierte DC an den Ort der Entzündung wandern.

Auf Grund der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse ist es allerdings unklar, ob *in vitro* der Nachweis einer antigenspezifischen Eliminierung aller aktivierten T-Lymphozyten gelingen wird. In den bisherigen Experimenten wurden ausschließlich humane polyklonal oder allogene aktivierte T-Zellen mit den mDC-FasL kokultiviert. Das Ziel einer

antigenspezifischen Eliminierung von autoreaktiven T-Lymphozyten ist jedoch Gegenstand der aktuell durchgeführten Experimente. Der Nachweis einer antigenspezifischen Deletion in einem autologen System könnte dabei unter Verwendung von T-Zellklonen mit Spezifität für unterschiedliche Antigene gelingen. Vorgesehen sind Versuche mit zwei T-Zellklonen unterschiedlicher Antigenpezifität, die mit verschiedenen Farbstoffen (z.B. PKH67 und PKH26) markiert und mit mDC-FasL kokultiviert werden, wobei die DC nur mit einem der beiden Antigene beladen werden. In einer durchflusszytometrischen Analyse sollte bei einer antigenspezifischen Deletion nur der T-Zellklon nachweisbar sein, dessen Spezifität nicht mit dem präsentierten Antigen übereinstimmt. Dabei sollten aktivierte T-Lymphozyten eingesetzt werden, um zunächst das optimale Verhältnis zwischen den mDC-FasL und den beiden T-Zellklonen zu ermitteln. In weiteren Untersuchungen könnten dann aktivierte und ruhende CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellklone getrennt voneinander untersucht werden.

IV.4.1 Indirekte Toleranzinduktion durch den Einsatz von mDC-FasL

In der Literatur werden verschiedene Wege beschrieben, durch die mittels Apoptose Toleranz induziert werden kann. Einige Arbeiten zeigen, dass auch die direkte Aufnahme von apoptotischem Material durch APC Toleranz hervorruft. Andere Untersuchungen stellen die Rolle des Zytokins IL-10 als toleranzinduzierend in den Vordergrund.

Im Körper fallen ständig apoptotische Zellen an, die beseitigt werden müssen. Die Phagozytose dieses apoptotischen Materials ist aber weit mehr als eine „Abfallbeseitigung“. Vielmehr wird sie als Mechanismus der peripheren Toleranz angesehen (Savill & Fadok, 2000; Steinman *et al.*, 2000). Die hier vorgestellten Experimente mit Jurkat T-Zellen und primären T-Zellen zeigen, dass mDC-FasL in der Lage sind, große Mengen an apoptotischen Zellen zu verursachen. Dieses apoptotische Material kann von gewebständigen DC aufgenommen werden und diese funktionell beeinflussen (Rubartelli *et al.*, 1997; Albert *et al.*, 1998). *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen demonstrieren, dass nekrotische Zellen eine Reifung von DC induzieren (Ishii *et al.*, 2001). Apoptotisches Material hat dagegen keinen reifungsinduzierenden Effekt auf die DC (Gallucci *et al.*, 1999; Sauter *et al.*, 2000). Untersuchungen bei Ratten zeigen, dass unreife DC apoptotisches Material aufnehmen und dieses in T-Zellbereiche der Lymphknoten transportieren können (Huang *et al.*, 2000). Apoptotisches Material wird aber auch als Quelle von Autoantigenen identifiziert, was möglicherweise für die Entstehung von Autoimmunkrankheiten wie z. B. dem systemischen

Lupus erythematoses von Bedeutung ist (Amel Kashipaz *et al.*, 2002; Chernysheva *et al.*, 2002).

Vor dem Hintergrund dieser Beobachtungen könnte das von den mDC-FasL verursachte apoptotische Material verschiedene Effekte *in vivo* haben: Nach der Aufnahme der apoptotischen Zellen durch gewebständige DC könnte zum einen sekundär periphere Toleranz vermittelt werden. Zum anderen könnte aber auch eine Immunreaktion gegenüber Autoantigenen induziert werden.

Eine wichtige Rolle bei der Toleranzinduktion kann auch das antiinflammatorische Zytokin IL-10 spielen (Moore *et al.*, 2001). Untersuchungen an humanen aktivierten T-Lymphozyten nach Fas-Stimulation zeigen, dass die IL-10-Expression verstärkt wird (Yang *et al.*, 2003). Eine IL-10-Sekretion kann auch nach Apoptoseinduktion (Daigle *et al.*, 2000) und CD36-Stimulation mit Antikörpern oder apoptotischen Zellen bei Monozyten beobachtet werden (Voll *et al.*, 1997). Das nach Fas-Aktivierung freigesetzte IL-10 kann auf gewebständige DC wirken. Stimulation mit IL-10 *in vitro* induziert bei humanen DC einen tolerogenen Phänotyp (Steinbrink *et al.*, 1999; Jonuleit *et al.*, 2001b). Mit IL-10 behandelte DC können *in vitro* bei humanen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zudem Anergie auslösen (Steinbrink *et al.*, 2002). *In vivo* Untersuchungen von Gao *et al.* (1998) in einem Mausmodell demonstrieren, dass das nach Apoptoseinduktion freigesetzte IL-10 auf APC wirkt. Diese APC können durch Stimulation von T-Lymphozyten einen T_H2-Phänotyp induzieren.

Durch den Einsatz von mDC-FasL zur Eliminierung antigenspezifischer Zellen könnte von den apoptotischen T-Lymphozyten IL-10 freigesetzt werden, welches immunmodulierend und somit toleranzinduzierend auf gewebständige APC wirken könnte. Damit könnten mDC-FasL auch über einen indirekten Mechanismus periphere Toleranz vermitteln.

IV.5 Ausblick

Die Ergebnisse der hier vorgestellten Untersuchungen werfen weitere Fragen zum Einsatz von mDC-FasL zur antigenspezifischen Eliminierung von T-Zellen auf. Das Ziel der nächsten Experimente sollte der Nachweis der Deletion von T-Lymphozyten in einem autologen System mit einem definierten Antigen sein. Die Durchführung solcher Experimente wurde bereits in der Diskussion beschrieben und ist Gegenstand der gegenwärtig durchgeführten Experimente. Da die Transduktionseffizienzen bei Verwendung der beiden adenoviralen Vektoren AxCANCre und AdloxPFasL für eine FasL-Expression nicht weiter erhöht werden

konnten, sollte für die antigenspezifischen Versuche eine positive Selektion der mDC-FasL erwogen werden. Da die nicht FasL-exprimierenden DC in den Kokulturen eine Stimulation statt einer Toleranz der T-Lymphozyten hervorrufen könnten, sollte eine Beimengung nicht FasL-exprimierender DC verhindert werden.

Ob der Maus-sFasL letztlich auf die Apoptoseinduktion humaner primärer T-Lymphozyten inhibierend wirkt oder nicht, sollte in weiteren Experimenten untersucht werden. Diese Versuche könnten Aufschluss darüber geben, ob ein FasL-Konstrukt verwendet werden sollte, das nicht durch Metalloproteinasen prozessiert wird. Vorrangiges Ziel ist aber die Etablierung einer Transduktionsmethode, die wegen der nicht kalkulierbaren Risiken bei einer potenziellen therapeutischen Anwendung auf einen adenoviralen Gentransfer verzichtet. Dabei sollte humaner FasL eingesetzt werden, um eine mögliche Immunreaktion auf den Maus-FasL zu vermeiden. Aufbauend auf den vorliegenden Ergebnissen sollte ein „ideales“ Vektorkonstrukt für die weiteren Versuche den humanen FasL als nicht prozessierbare Form beinhalten, gleichzeitig mit einem Reporter gen wie z. B. EGFP ausgestattet sein sowie das spezifische Antigen kodieren. Dem Antigen könnte zur Präsentation über MHC-Klasse-II-Moleküle zusätzlich eine LAMP-1 Sequenz angehängt werden (Bonini *et al.*, 2001).

V Literatur

- Aggarwal, B. B. (2003). Signaling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* **3**, 745-756.
- Albert, M.L., Pearce, S.F., Francisco, L.M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R.L. & Bhardwaj, N. (1998). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* **188**, 1359-1368.
- Alderson, M., Tough, T., Davis-Smith, T., Braddy, S., Falk, B., Schooley, K., Goodwin, R., Smith, C., Ramsdell, F. & Lynch, D. (1995). Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med* **181**, 71-77.
- Algeciras-Schimmich, A., Griffith, T.S., Lynch, D.H. & Paya, C.V. (1999). Cell cycle-dependent regulation of FLIP levels and susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* **162**, 5205-5211.
- Allison, J., Georgiou, H.M., Strasser, A. & Vaux, D.L. (1997). Transgenic expression of CD95 ligand on islet beta cells induces a granulocytic infiltration but does not confer immune privilege upon islet allografts. *PNAS* **94**, 3943-3947.
- Amel Kashipaz, M.R., Huggins, M.L., Powell, R.J. & Todd, I. (2002). Human autologous mixed lymphocyte reaction as an in vitro model for autoreactivity to apoptotic antigens. *Immunology* **107**, 358-365.
- Ammon, C., Meyer, S.P., Schwarzfischer, L., Krause, S.W., Andreesen, R. & Kreutz, M. (2000). Comparative analysis of integrin expression on monocyte-derived macrophages and monocyte-derived dendritic cells. *Immunology* **100**, 364-369.
- Andersson, K., Wrammert, J. & Leanderson, T. (1998). Affinity selection and repertoire shift: paradoxes as a consequence of somatic mutation? *Immunol Rev* **162**, 173-182.
- Anton, M. & Graham, F.L. (1995). Site-specific recombination mediated by an adenovirus vector expressing the Cre recombinase protein: a molecular switch for control of gene expression. *J Virol* **69**, 4600-4606.
- Appleman, L.J. & Boussiotis, V.A. (2003). T cell anergy and costimulation. *Immunol Rev* **192**, 161-180.
- Ardavin, C., Martinez del Hoyo, G., Martin, P., Anjuere, F., Arias, C.F., Marin, A.R., Ruiz, S., Parrillas, V. & Hernandez, H. (2001). Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol* **22**, 691-700.
- Arthur, J.F., Butterfield, L.H., Roth, M.D., Bui, L.A., Kiertscher, S.M., Lau, R., Dubinett, S., Glaspy, J., McBride, W.H. & Economou, J.S. (1997). A comparison of gene transfer methods in human dendritic cells. *Cancer Gene Ther* **4**, 17-25.
- Askenasy, N., Yolcu, E.S., Wang, Z. & Shirwan, H. (2003). Display of Fas ligand protein on cardiac vasculature as a novel means of regulating allograft rejection. *Circulation* **107**, 1525-1531.
- Bacso, Z., Everson, R.B. & Eliason, J.F. (2000). The DNA of annexin V-binding apoptotic cells is highly fragmented. *Cancer Res* **60**, 4623-4628.
- Badley, A., McElhinny, J., Leibson, P., Lynch, D., Alderson, M. & Paya, C. (1996). Upregulation of Fas ligand expression by human immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected T lymphocytes. *J. Virol.* **70**, 199-206.

- Baert, F., Noman, M., Vermeire, S., Van Assche, G., D' Haens, G., Carbonez, A. & Rutgeerts, P. (2003). Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N Engl J Med* **348**, 601-608.
- Banchereau, J. & Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B. & Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**, 18767-18811.
- Banchereau, J., Schuler Thurner, B., Palucka, A.K. & Schuler, G. (2001). Dendritic cells as vectors for therapy. *Cell* **106**, 271-274.
- Batteux, F., Tourneur, L., Trebeden, H., Charreire, J. & Chiocchia, G. (1999). Gene therapy of experimental autoimmune thyroiditis by in vivo administration of plasmid DNA coding for Fas ligand. *J Immunol* **162**, 603-608.
- Bedrosian, I., Mick, R., Xu, S., Nisenbaum, H., Faries, M., Zhang, P., Cohen, P.A., Koski, G. & Czerniecki, B.J. (2003). Intranodal administration of peptide-pulsed mature dendritic cell vaccines results in superior CD8+ T-cell function in melanoma patients. *J Clin Oncol* **21**, 3826-3835.
- Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L. & Finberg, R.W. (1997). Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**, 1320-1323.
- Berger, T.G., Feuerstein, B., Strasser, E., Hirsch, U., Schreiner, D., Schuler, G. & Schuler Thurner, B. (2002). Large-scale generation of mature monocyte-derived dendritic cells for clinical application in cell factories. *J Immunol Methods* **268**, 131-140.
- Bilbao, G., Zhang, H., Contreras, J.L., Zhou, T., Feng, M., Saito, I., Mountz, J.D. & Curiel, D.T. (1999). Construction of a recombinant adenovirus vector encoding Fas ligand with a CRE/Loxp inducible system. *Transplant Proc* **31**, 792-793.
- Biswas, R.S., Cha, H.J., Hardwick, J.M. & Srivastava, R.K. (2001). Inhibition of drug-induced Fas ligand transcription and apoptosis by Bcl-XL. *Mol Cell Biochem.* **225**, 7-20.
- Boise, L.H., Noel, P.J. & Thompson, C.B. (1995). CD28 and apoptosis. *Current Opinion in Immunology* **7**, 620-625.
- Bonini, C., Lee, S.P., Riddell, S.R. & Greenberg, P.D. (2001). Targeting antigen in mature dendritic cells for simultaneous stimulation of CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* **166**, 5250-5257.
- Bossi, G. & Griffiths, G.M. (1999). Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. *Nat Med* **5**, 90-96.
- Boyton, R.J. & Altmann, D.M. (2002). Transgenic models of autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* **127**, 4-11.
- Brown, B.D. & Lillicrap, D. (2002). Dangerous liaisons: the role of "danger" signals in the immune response to gene therapy. *Blood* **100**, 1133-1140.
- Budd, R.C. (2001). Activation-induced cell death. *Curr Opin Immunol* **13**, 356-362.
- Budd, R.C. (2002). Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. *J Clin Invest* **109**, 437-441.

- Buonocore, S., Van Meirvenne, S., Demoor, F.X., Paulart, F., Thielemans, K., Goldman, M. & Flamand, V. (2002). Dendritic cells transduced with viral interleukin 10 or Fas ligand: no evidence for induction of allotolerance in vivo. *Transplantation* **73**, S27-30.
- Buonocore, S., Paulart, F., Le Moine, A., Braun, M., Salmon, I., Van Meirvenne, S., Thielemans, K., Goldman, M. & Flamand, V. (2003). Dendritic cells overexpressing CD95 (Fas) ligand elicit vigorous allospecific T-cell responses in vivo. *Blood* **101**, 1469-1476.
- Cascino, I., Fiucci, G., Papoff, G. & Ruberti, G. (1995). Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. *J Immunol* **154**, 2706-2713.
- Chambers, C.A. (2001). The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited. *Trends Immunol* **22**, 217-223.
- Chen, P., Tian, J., Kovesdi, I. & Bruder, J.T. (1998). Interaction of the adenovirus 14.7-kDa protein with FLICE inhibits Fas ligand-induced apoptosis. *J Biol Chem* **10**, 5815-5820.
- Chen, Y.-L., Chen, S.-H., Wang, J.-Y. & Yang, B.-C. (2003). Fas ligand on tumor cells mediates inactivation of neutrophils. *J Immunol* **171**, 1183-1191.
- Cheng, J., Zhou, T., Liu, C., Shapiro, J.P., Brauer, M.J., Kiefer, M.C., Barr, P.J. & Mountz, J.D. (1994). Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* **263**, 1759-1762.
- Chernysheva, A.D., Kirou, K.A. & Crow, M.K. (2002). T cell proliferation induced by autologous non-T cells is a response to apoptotic cells processed by dendritic cells. *J Immunol* **169**, 1241-1250.
- Cohen, G.M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* **326**, 1-16.
- Collette, Y., Benziane, A., Razanajaona, D. & Olive, D. (1998). Distinct regulation of T-cell death by CD28 depending on both its aggregation and T-cell receptor triggering: a role for Fas-FasL. *Blood* **92**, 1350-1363.
- Colombetti, S., Benigni, F., Basso, V. & Mondino, A. (2002). Clonal anergy is maintained independently of T cell proliferation. *J Immunol* **169**, 6178-6186.
- Daigle, I., Ruckert, B., Schnetzler, G. & Simon, H.U. (2000). Induction of the IL-10 gene via the fas receptor in monocytes--an anti-inflammatory mechanism in the absence of apoptosis. *Eur J Immunol* **30**, 2991-2997.
- Daniel, P., Kroidl, A., Cayeux, S., Bargou, R., Blankenstein, T. & Dorken, B. (1997). Costimulatory signals through B7.1/CD28 prevent T cell apoptosis during target cell lysis. *J Immunol* **159**, 3808-3815.
- Dhein, J., Walczak, H., Baumler, C., Debatin, K.M. & Krammer, P.H. (1995). Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95) [see comments]. *Nature* **373**, 438-441.
- Diao, J., Smythe, J.A., Smyth, C., Rowe, P.B. & Alexander, I.E. (1999). Human PBMC-derived dendritic cells transduced with an adenovirus vector induce cytotoxic T-lymphocyte responses against a vector-encoded antigen in vitro. *Gene Ther* **6**, 845-853.
- Dietz, A.B. & Vuk Pavlovic, S. (1998). High efficiency adenovirus-mediated gene transfer to human dendritic cells. *Blood* **91**, 392-398.

- Dyall, J., Latouche, J.B., Schnell, S. & Sadelain, M. (2001). Lentivirus-transduced human monocyte-derived dendritic cells efficiently stimulate antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood* **97**, 114-121.
- Egner, W., Andreesen, R. & Hart, D.N. (1993). Allostimulatory cells in fresh human blood: heterogeneity in antigen-presenting cell populations. *Transplantation* **56**, 945-950.
- Elhalel, M.D., Huang, J.-H., Schmidt, W., Rachmilewitz, J. & Tykocinski, M.L. (2003). CTLA-4·FasL induces alloantigen-specific hyporesponsiveness. *J Immunol* **170**, 5842-5850.
- Ermann, J. & Fathman, C.G. (2001). Autoimmune diseases: genes, bugs and failed regulation. *Nat Immunol* **2**, 759-761.
- Esser, M., Dinglasan, R., Krishnamurthy, B., Gullo, C., Graham, M. & Braciale, V. (1997). IL-2 induces Fas ligand/Fas (CD95L/CD95) cytotoxicity in CD8+ and CD4+ T lymphocyte clones. *J Immunol* **158**, 5612-5618.
- Fathman, C.G., Costa, G.L. & Seroogy, C.M. (2000). Gene therapy for autoimmune disease. *Clin Immunol* **95**, S39-43.
- Fearnley, D.B., Whyte, L.F., Carnoutsos, S.A., Cook, A.H. & Hart, D.N.J. (1999). Monitoring human blood dendritic cell numbers in normal individuals and in stem cell transplantation. *Blood* **93**, 728-736.
- Ferguson, T.A., Stuart, P.M., Herndon, J.M. & Griffith, T.S. (2003). Apoptosis, tolerance, and regulatory T cells old wine, new wineskins. *Immunol Rev* **193**, 111-123.
- Fleck, M., Zhang, H.G., Kern, E.R., Hsu, H.C., Muller-Ladner, U. & Mountz, J.D. (2001). Treatment of chronic sialadenitis in a murine model of Sjogren's syndrome by local fasL gene transfer. *Arthritis Rheum* **44**, 964-973.
- Fleischer, B. (1994). Superantigens. *APMIS* **102**, 3-12.
- Gahn, B., Siller Lopez, F., Pirooz, A.D., Yvon, E., Gottschalk, S., Longnecker, R., Brenner, M.K., Heslop, H.E., Aguilar Cordova, E. & Rooney, C.M. (2001). Adenoviral gene transfer into dendritic cells efficiently amplifies the immune response to LMP2A antigen: a potential treatment strategy for Epstein-Barr virus--positive Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* **93**, 706-713.
- Gainer, A.L., Suarez Pinzon, W.L., Min, W.P., Swiston, J.R., Hancock Friesen, C., Korbitt, G.S., Rajotte, R.V., Warnock, G.L. & Elliott, J.F. (1998). Improved survival of biologically transfected mouse islet allografts expressing CTLA4-Ig or soluble Fas ligand. *Transplantation* **66**, 194-199.
- Galle, P., Hofmann, W., Walczak, H., Schaller, H., Otto, G., Stremmel, W., Krammer, P. & Runkel, L. (1995). Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med* **182**, 1223-1230.
- Gallucci, S., Lolkema, M. & Matzinger, P. (1999). Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* **5**, 1249-1255.
- Gao, Y., Herndon, J.M., Zhang, H., Griffith, T.S. & Ferguson, T.A. (1998). Antiinflammatory effects of CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis. *J Exp Med* **188**, 887-896.
- Georgantas, R.W., 3rd, Leong, K.W. & August, J.T. (2000). Antigen-specific induction of peripheral T cell tolerance in vivo by codelivery of DNA vectors encoding antigen and Fas ligand. *Hum Gene Ther* **11**, 851-858.

- Graham, F.L. & Prevec, L. (1995). Methods for construction of adenovirus vectors. *Mol Biotechnol* **3**, 207-220.
- Grassi, F., Dezutter Dambuyant, C., McIlroy, D., Jacquet, C., Yoneda, K., Imamura, S., Boumsell, L., Schmitt, D., Autran, B., Debre, P. & Hosmalin, A. (1998). Monocyte-derived dendritic cells have a phenotype comparable to that of dermal dendritic cells and display ultrastructural granules distinct from Birbeck granules. *J Leukoc Biol* **64**, 484-493.
- Gregory, M.S., Repp, A.C., Holhbaum, A.M., Saff, R.R., Marshak Rothstein, A. & Ksander, B.R. (2002). Membrane Fas ligand activates innate immunity and terminates ocular immune privilege. *J Immunol* **169**, 2727-2735.
- Griffith, T.S. & Lynch, D.H. (1998). TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. *Curr Opin Immunol* **10**, 559-563.
- Griffith, T.S. & Ferguson, T.A. (1997). The role of FasL-induced apoptosis in immune privilege. *Immunol Today* **18**, 240-244.
- Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C. & Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **20**, 621-667.
- Gunzer, M., Janich, S., Varga, G. & Grabbe, S. (2001). Dendritic cells and tumor immunity. *Semin Immunol* **13**, 291-302.
- Guo, M. & Bruce, A.H. (1999). Cell proliferation and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 745-752.
- Hackstein, H., Morelli, A.E. & Thomson, A.W. (2001). Designer dendritic cells for tolerance induction: guided not misguided missiles. *Trends Immunol* **22**, 437-442.
- Harrison, L.C. & Hafler, D.A. (2000). Antigen-specific therapy for autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* **12**, 704-711.
- Hartmann, G., Weiner, G.J. & Krieg, A.M. (1999). CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *PNAS* **96**, 9305-9310.
- Hartwig, U.F., Robbers, M., Wickenhauser, C. & Huber, C. (2002). Murine acute graft-versus-host disease can be prevented by depletion of alloreactive T lymphocytes using activation-induced cell death. *Blood* **99**, 3041-3049.
- Hegde, N.R., Chevalier, M.S. & Johnson, D.C. (2003). Viral inhibition of MHC class II antigen presentation. *Trends Immunol* **24**, 278-285.
- Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-776.
- Hidaka, C., Milano, E., Leopold, P.L., Bergelson, J.M., Hackett, N.R., Finberg, R.W., Wickham, T.J., Kovesdi, I., Roelvink, P. & Crystal, R.G. (1999). CAR-dependent and CAR-independent pathways of adenovirus vector-mediated gene transfer and expression in human fibroblasts. *J Clin Invest* **103**, 579-587.
- Hohlbaum, A.M., Gregory, M.S., Ju, S.T. & Marshak Rothstein, A. (2001). Fas ligand engagement of resident peritoneal macrophages in vivo induces apoptosis and the production of neutrophil chemotactic factors. *J Immunol* **167**, 6217-6224.
- Hollender, P., Ittelett, D., Villard, F., Eymard, J.C., Jeannesson, P. & Bernard, J. (2002). Active matrix metalloprotease-9 in and migration pattern of dendritic cells matured in clinical grade culture conditions. *Immunobiology* **206**, 441-458.

- Huang, F.-P., Platt, N., Wykes, M., Major, J.R., Powell, T.J., Jenkins, C.D. & MacPherson, G.G. (2000). A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp Med* **191**, 435-444.
- Huang, S., Endo, R.I. & Nemerow, G.R. (1995). Upregulation of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 on human monocytes and T lymphocytes facilitates adenovirus-mediated gene delivery. *J Virol* **69**, 2257-2263.
- Ichim, T.E., Zhong, R. & Min, W.-P. (2003). Prevention of allograft rejection by in vitro generated tolerogenic dendritic cells. *Transplant Immunology* **11**, 295-306.
- Inaba, M., Kurasawa, K., Mamura, M., Kumano, K., Saito, Y. & Iwamoto, I. (1999). Primed T cells are more resistant to Fas-mediated activation-induced cell death than naive T cells. *J Immunol* **163**, 1315-1320.
- Ishii, K.J., Suzuki, K., Coban, C., Takeshita, F., Itoh, Y., Matoba, H., Kohn, L.D. & Klinman, D.M. (2001). Genomic DNA released by dying cells induces the maturation of APCs. *J Immunol* **167**, 2602-2607.
- Jäättelä, M. & Tschopp, J. (2003). Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat Immunol* **4**, 416-423.
- Jameson, S.C. (2002). Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol* **2**, 547-556.
- Jenkins, M.K., Khoruts, A., Ingulli, E., Mueller, D.L., McSorley, S.J., Reinhardt, R.L., Itano, A. & Pape, K.A. (2001). In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu Rev Immunol* **19**, 23-45.
- Jenne, L., Schuler, G. & Steinkasserer, A. (2001). Viral vectors for dendritic cell-based immunotherapy. *Trends Immunol* **22**, 102-107.
- Jonuleit, H., Kuhn, U., Muller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J. & Enk, A.H. (1997). Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* **27**, 3135-3142.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J. & Enk, A.H. (2000a). Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* **192**, 1213-1222.
- Jonuleit, H., Tuting, T., Steitz, J., Bruck, J., Giesecke, A., Steinbrink, K., Knop, J. & Enk, A.H. (2000b). Efficient transduction of mature CD83+ dendritic cells using recombinant adenovirus suppressed T cell stimulatory capacity. *Gene Ther* **7**, 249-254.
- Jonuleit, H., Giesecke-Tuettenberg, A., Tuting, T., Thurner-Schuler, B., Stuge, T.B., Paragnik, L., Kandemir, A., Lee, P.P., Schuler, G., Knop, J. & Enk, A.H. (2001a). 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**, 243-251.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Steinbrink, K. & Enk, A.H. (2001b). Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol* **22**, 394-400.
- Jonuleit, H., Adema, G. & Schmitt, E. (2003). Immune regulation by regulatory T cells: implications for transplantation. *Transpl Immunol* **11**, 267-276.

- Ju, S.T., Panka, D.J., Cui, H., Ettinger, R., el-Khatib, M., Sherr, D.H., Stanger, B.Z. & Marshak-Rothstein, A. (1995). Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* **373**, 444-448.
- Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R.W., Kastelein, R.A., Bazan, F. & Liu, Y.J. (2001). Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* **194**, 863-869.
- Kakinuma, C., Takagaki, K., Yatomi, T., Nakamura, N., Nagata, S., Uemura, A. & Shibutani, Y. (1999). Acute toxicity of an anti-Fas antibody in mice. *Toxicol Pathol* **27**, 412-420.
- Kang, S.M., Schneider, D.B., Lin, Z., Hanahan, D., Dichek, D.A., Stock, P.G. & Baekkeskov, S. (1997). Fas ligand expression in islets of Langerhans does not confer immune privilege and instead targets them for rapid destruction. *Nat Med* **3**, 738-743.
- Kaplan, J.M., Yu, Q., Piraino, S.T., Pennington, S.E., Shankara, S., Woodworth, L.A. & Roberts, B.L. (1999). Induction of antitumor immunity with dendritic cells transduced with adenovirus vector-encoding endogenous tumor-associated antigens. *J Immunol* **163**, 699-707.
- Kayagaki, N., Kawasaki, A., Ebata, T., Ohmoto, H., Ikeda, S., Inoue, S., Yoshino, K., Okumura, K. & Yagita, H. (1995). Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med* **182**, 1777-1783.
- Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Nagao, F., Matsuo, S., Maeda, H., Okumura, K. & Yagita, H. (1997). Polymorphism of murine Fas ligand that affects the biological activity. *PNAS* **94**, 3914-3919.
- Kim, S., Ki, J.Y., Lee, T.H., Suk, K., Cha, H.S., Koh, E.M., Yagita, H. & Lee, M.S. (2002a). Soluble Fas ligand-susceptible "memory" cells in mice but not in human: potential role of soluble Fas ligand in deletion of auto-reactive cells. *Autoimmunity* **35**, 15-20.
- Kim, S.H., Kim, S., Oligino, T.J. & Robbins, P.D. (2002b). Effective treatment of established mouse collagen-induced arthritis by systemic administration of dendritic cells genetically modified to express FasL. *Mol Ther* **6**, 584-590.
- Kirchhoff, S., Sebens, T., Baumann, S., Krueger, A., Zawatzky, R., Li-Weber, M., Meinel, E., Neipel, F., Fleckenstein, B. & Krammer, P.H. (2002). Viral IFN-regulatory factors inhibit activation-induced cell death via two positive regulatory IFN-regulatory factor 1-dependent domains in the CD95 ligand promoter. *J Immunol* **168**, 1226-1234.
- Kirk, C.J. & Mule, J.J. (2000). Gene-modified dendritic cells for use in tumor vaccines. *Hum Gene Ther* **11**, 797-806.
- Kishimoto, H. & Sprent, J. (2000). The thymus and central tolerance. *Clin Immunol* **95**, S3-7.
- Knox, P.G., Milner, A.E., Green, N.K., Eliopoulos, A.G. & Young, L.S. (2003). Inhibition of metalloproteinase cleavage enhances the cytotoxicity of Fas ligand. *J Immunol* **170**, 677-685.
- Koppi, T.A., Tough Bement, T., Lewinsohn, D.M., Lynch, D.H. & Alderson, M.R. (1997). CD40 ligand inhibits Fas/CD95-mediated apoptosis of human blood-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* **27**, 3161-3165.
- Kosiewicz, M.M., Krishnan, A., Worthington, M.T., Matriano, J.A. & Ross, W.G. (2002). B cells engineered to express Fas ligand suppress pre-sensitized antigen-specific T cell responses in vivo. *Eur J Immunol* **32**, 1679-1687.
- Krammer, P.H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**, 789-795.

- Kroemer, G., Dallaporta, B. & Resche Rigon, M. (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* **60**, 619-642.
- Kruse, M., Meinel, E., Henning, G., Kuhnt, C., Berchtold, S., Berger, T., Schuler, G. & Steinkasserer, A. (2001). Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on mature CD83+ dendritic cells and is up-regulated by IL-1 beta. *J Immunol* **167**, 1989-1995.
- Kurts, C., Heath, W.R., Kosaka, H., Miller, J.F. & Carbone, F.R. (1998). The peripheral deletion of autoreactive CD8+ T cells induced by cross-presentation of self-antigens involves signaling through CD95 (Fas, Apo-1). *J Exp Med* **188**, 415-420.
- Kusuhara, M., Matsue, K., Edelbaum, D., Loftus, J., Takashima, A. & Matsue, H. (2002). Killing of naive T cells by CD95L-transfected dendritic cells (DC): in vivo study using killer DC-DC hybrids and CD4(+) T cells from DO11.10 mice. *Eur J Immunol* **32**, 1035-1043.
- Labrecque, N., Thibodeau, J., Mourad, W. & Sekaly, R. (1994). T cell receptor-major histocompatibility complex class II interaction is required for the T cell response to bacterial superantigens. *J. Exp. Med.* **180**, 1921-1929.
- Lanzavecchia, A. (1996). Mechanisms of antigen uptake for presentation. *Current Opinion in Immunology* **8**, 348-354.
- Larregina, A.T., Morelli, A.E., Dewey, R.A., Castro, M.G., Fontana, A. & Lowenstein, P.R. (1998). FasL induces Fas/Apo1-mediated apoptosis in human embryonic kidney 293 cells routinely used to generate E1-deleted adenoviral vectors. *Gene Ther* **5**, 563-568.
- Lehner, M., Felzmann, T., Clodi, K. & Holter, W. (2001). Type I interferons in combination with bacterial stimuli induce apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **98**, 736-742.
- Lernmark, A. (2002). Controlling the controls: GAD65 autoreactive T cells in type 1 diabetes. *J Clin Invest* **109**, 869-870.
- Leverkus, M., Walczak, H., McLellan, A., Fries, H.W., Terbeck, G., Brocker, E.B. & Kampgen, E. (2000). Maturation of dendritic cells leads to up-regulation of cellular FLICE-inhibitory protein and concomitant down-regulation of death ligand-mediated apoptosis. *Blood* **96**, 2628-2631.
- Li, X.K., Okuyama, T., Tamura, A., Enosawa, S., Kaneda, Y., Takahara, S., Funashima, N., Yamada, M., Amemiya, H. & Suzuki, S. (1998). Prolonged survival of rat liver allografts transfected with Fas ligand-expressing plasmid. *Transplantation* **66**, 1416-1423.
- Lipsky, P.E. (2001). Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nat Immunol* **2**, 764-766.
- Liu, Y.J. (2001). Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* **106**, 259-262.
- Liu, Z., Xu, X., Hsu, H.-C., Tousson, A., Yang, P.-A., Wu, Q., Liu, C., Yu, S., Zhang, H.-G. & Mountz, J.D. (2003). CII-DC-AdTRAIL cell gene therapy inhibits infiltration of CII-reactive T cells and CII-induced arthritis. *J Clin Invest* **112**, 1332-1341.
- Li-Weber, M., Laur, O., Hekele, A., Coy, J., Walczak, H. & Krammer, P.H. (1998). A regulatory element in the CD95 (APO-1/Fas) ligand promoter is essential for responsiveness to TCR-mediated activation. *Eur J Immunol* **28**, 2373-2383.

- Lu, L., Qian, S., Hershberger, P., Rudert, W., Lynch, D. & Thomson, A. (1997). Fas ligand (CD95L) and B7 expression on dendritic cells provide counter-regulatory signals for T cell survival and proliferation. *J Immunol* **158**, 5676-5684.
- Lu, L., Lee, W.C., Takayama, T., Qian, S., Gambotto, A., Robbins, P.D. & Thomson, A.W. (1999). Genetic engineering of dendritic cells to express immunosuppressive molecules (viral IL-10, TGF-beta, and CTLA4Ig). *J Leukoc Biol* **66**, 293-296.
- Luft, T., Jefford, M., Luetjens, P., Toy, T., Hochrein, H., Masterman, K.A., Maliszewski, C., Shortman, K., Cebon, J. & Maraskovsky, E. (2002). Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E(2) regulates the migratory capacity of specific DC subsets. *Blood* **100**, 1362-1372.
- Lundqvist, A., Choudhury, A., Nagata, T., Andersson, T., Quinn, G., Fong, T., Maitland, N., Pettersson, S., Paulie, S. & Pisa, P. (2002a). Recombinant adenovirus vector activates and protects human monocyte-derived dendritic cells from apoptosis. *Hum Gene Ther* **13**, 1541-1549.
- Lundqvist, A., Nagata, T., Kiessling, R. & Pisa, P. (2002b). Mature dendritic cells are protected from Fas/CD95-mediated apoptosis by upregulation of Bcl-X(L). *Cancer Immunol Immunother* **51**, 139-144.
- Lutz, M.B. & Schuler, G. (2002). Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* **23**, 445-449.
- Lyakh, L.A., Koski, G.K., Young, H.A., Spence, S.E., Cohen, P.A. & Rice, N.R. (2002). Adenovirus type 5 vectors induce dendritic cell differentiation in human CD14(+) monocytes cultured under serum-free conditions. *Blood* **99**, 600-608.
- Mahnke, K., Schmitt, E., Bonifaz, L., Enk, A.H. & Jonuleit, H. (2002). Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol Cell Biol* **80**, 477-483.
- Martinez-Lorenzo, M.J., Alava, M.A., Gamen, S., Kim, K.J., Chuntharapai, A., Pineiro, A., Naval, J. & Anel, A. (1998). Involvement of APO2 ligand/TRAIL in activation-induced death of Jurkat and human peripheral blood T cells. *Eur J Immunol* **28**, 2714-2725.
- Martinez-Lorenzo, M.J., Anel, A., Gamen, S., Monleon, I., Lasierra, P., Larrad, L., Pineiro, A., Alava, M.A. & Naval, J. (1999). Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles. *J Immunol* **163**, 1274-1281.
- Matsue, H., Matsue, K., Walters, M., Okumura, K., Yagita, H. & Takashima, A. (1999). Induction of antigen-specific immunosuppression by CD95L cDNA-transfected 'killer' dendritic cells. *Nat Med* **5**, 930-937.
- Matsue, H., Matsue, K., Kusahara, M., Kumamoto, T., Okumura, K., Yagita, H. & Takashima, A. (2001). Immunosuppressive properties of CD95L-transduced "killer" hybrids created by fusing donor- and recipient-derived dendritic cells. *Blood* **98**, 3465-3472.
- Matzinger, P. (1991). The JAM test. A simple assay for DNA fragmentation and cell death. *J Immunol Methods* **145**, 185-192.
- McDevitt, H.O. (2000). Discovering the role of the major histocompatibility complex in the immune response. *Annu Rev Immunol* **18**, 1-17.

- Meidenbauer, N., Marienhagen, J., Laumer, M., Vogl, S., Heymann, J., Andreesen, R. & Mackensen, A. (2003). Survival and tumor localization of adoptively transferred Melan-A-specific T cells in melanoma patients. *J Immunol* **170**, 2161-2169.
- Meinl, E. & Hohlfeld, R. (2002). Immunopathogenesis of multiple sclerosis: MBP and beyond. *Clin Exp Immunol* **128**, 395-397.
- Miller, J.F., Kurts, C., Allison, J., Kosaka, H., Carbone, F. & Heath, W.R. (1998). Induction of peripheral CD8+ T-cell tolerance by cross-presentation of self antigens. *Immunol Rev* **165**, 267-277.
- Min, W.P., Gorczynski, R., Huang, X.Y., Kushida, M., Kim, P., Obataki, M., Lei, J., Suri, R.M. & Cattral, M.S. (2000). Dendritic cells genetically engineered to express Fas ligand induce donor-specific hyporesponsiveness and prolong allograft survival. *J Immunol* **164**, 161-167.
- Mocci, S., Lafferty, K. & Howard, M. (2000). The role of autoantigens in autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* **12**, 725-730.
- Molnar-Kimber, K.L., Serman, D.H., Chang, M., Kang, E.H., ElBash, M., Lanuti, M., Elshami, A., Gelfand, K., Wilson, J.M., Kaiser, L.R. & Albelda, S.M. (1998). Impact of preexisting and induced humoral and cellular immune responses in an adenovirus-based gene therapy phase I clinical trial for localized mesothelioma. *Hum Gene Ther* **9**, 2121-2133.
- Mondino, A., Khoruts, A. & Jenkins, M.K. (1996). The anatomy of T-cell activation and tolerance. *PNAS* **93**, 2245-2252.
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L. & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* **19**, 683-765.
- Morrison, L., Lukacher, A., Braciale, V., Fan, D. & Braciale, T. (1986). Differences in antigen presentation to MHC class I-and class II- restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones. *J Exp Med* **163**, 903-921.
- Mottram, P.L. (2003). Past, present and future drug treatment for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Immunol Cell Biol* **81**, 350-353.
- Mountz, J.D., Bluethmann, H., Zhou, T. & Wu, J. (1994). Defective clonal deletion and anergy induction in TCR transgenic lpr/lpr mice. *Semin Immunol* **6**, 27-37.
- Nagata, S. & Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science* **267**, 1449-1456.
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* **88**, 355-365.
- Nagata, S. (1999). Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet* **33**, 29-55.
- Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* **256**, 12-18.
- Negoescu, A., Lorimier, P., Labat-Moleur, F., Azoti, L., Robert, C., Guillermet, C., Brambilla, C. & Brambilla, E. (1997). TUNEL: improvement and evaluation of the method for in situ apoptotic cell identification. *Biochemica* **2**, 12-17.
- Nemerow, G.R. & Stewart, P.L. (1999). Role of alpha v integrins in adenovirus cell entry and gene delivery. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 725-734.
- Newell, M.K. & Desbarats, J. (1999). Fas Ligand: receptor or ligand? *Apoptosis* **4**, 311-315.
- Nicolo, C., Tomassini, B., Rippo, M.R. & Testi, R. (2001). UVB-induced apoptosis of human dendritic cells: contribution by caspase-dependent and caspase-independent pathways. *Blood* **97**, 1803-1808.

- Oberholzer, A., Oberholzer, C., Bahjat, K.S., Ungaro, R., Tannahill, C.L., Murday, M., Bahjat, F.R., Abouhamze, Z., Tsai, V., LaFace, D., Hutchins, B., Moldawer, L.L. & Clare Salzler, M.J. (2002). Increased survival in sepsis by in vivo adenovirus-induced expression of IL-10 in dendritic cells. *J Immunol* **168**, 3412-3418.
- O'Flaherty, E., Wong, W.K., Pettit, S.J., Seymour, K., Ali, S. & Kirby, J.A. (2000). Regulation of T-cell apoptosis: a mixed lymphocyte reaction model. *Immunology* **100**, 289-299.
- Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T. & Nagata, S. (1993). Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* **364**, 806-809.
- Ohashi, P.S. & DeFranco, A.L. (2002). Making and breaking tolerance. *Curr Opin Immunol* **14**, 744-759.
- Opferman, J.T. & Korsmeyer, S.J. (2003). Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol*. 2003 May;4(5):410-5 **4**, 410-415.
- O'Sullivan, B.J. & Thomas, R. (2002). CD40 ligation conditions dendritic cell antigen-presenting function through sustained activation of NF-kappa B. *J Immunol* **168**, 5491-5498.
- Ottonello, L., Tortolina, G., Amelotti, M. & Dallegri, F. (1999). Soluble Fas ligand is chemotactic for human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* **162**, 3601-3606.
- Palmer, E. (2003). Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol* **3**, 383-391.
- Palucka, K.A., Taquet, N., Sanchez Chapuis, F. & Gluckman, J.C. (1998). Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J Immunol* **160**, 4587-4595.
- Papoff, G., Cascino, I., Eramo, A., Starace, G., Lynch, D. & Ruberti, G. (1996). An N-terminal domain shared by Fas/Apo-1 (CD95) soluble variants prevents cell death in vitro. *J Immunol* **156**, 4622-4630.
- Park, D.R., Thomsen, A.R., Frevert, C.W., Pham, U., Skerrett, S.J., Kiener, P.A. & Liles, W.C. (2003). Fas (CD95) induces proinflammatory cytokine responses by human monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol* **170**, 6209-6216.
- Penna, G. & Adorini, L. (2000). 1{alpha},25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol* **164**, 2405-2411.
- Piemonti, L., Monti, P., Allavena, P., Sironi, M., Soldini, L., Leone, B.E., Succi, C. & Di Carlo, V. (1999). Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol* **162**, 6473-6481.
- Puck, J.M. & Sneller, M.C. (1997). ALPS: an autoimmune human lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis. *Semin Immunol* **9**, 77-84.
- Radvanyi, L., Shi, Y., Vaziri, H., Sharma, A., Dhala, R., Mills, G. & Miller, R. (1996). CD28 costimulation inhibits TCR-induced apoptosis during a primary T cell response. *J Immunol* **156**, 1788-1798.
- Randolph, G.J. (2001). Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators. *Semin Immunol* **13**, 267-274.

- Rea, D., Schagen, F.H., Hoeben, R.C., Mehtali, M., Havenga, M.J., Toes, R.E., Melief, C.J. & Offringa, R. (1999). Adenoviruses activate human dendritic cells without polarization toward a T-helper type 1-inducing subset. *J Virol* **73**, 10245-10253.
- Rebel, V.I., Hartnett, S., Denham, J., Chan, M., Finberg, R. & Sieff, C.A. (2000). Maturation and lineage-specific expression of the coxsackie and adenovirus receptor in hematopoietic cells. *Stem Cells* **18**, 176-182.
- Reddy, A., Sapp, M., Feldman, M., Subklewe, M. & Bhardwaj, N. (1997). A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells. *Blood* **90**, 3640-3646.
- Rieux-Laucat, F., Fischer, A. & Deist, F.L. (2003). Cell-death signaling and human disease. *Curr Opin Immunol* **15**, 325-331.
- Robert, C., Klein, C., Cheng, G., Kogan, A., Mulligan, R.C., von Andrian, U.H. & Kupper, T.S. (2003). Gene therapy to target dendritic cells from blood to lymph nodes. *Gene Therapy* **10**, 1479-1486.
- Romani, N., Reider, D., Heuer, M., Ebner, S., Kämpgen, E., Eibl, B., Niederwieser, D. & Schuler, G. (1996). Generation of mature dendritic cells from human blood: An improved method with special regard to clinical applicability. *Journal of Immunological Methods* **196**, 137-151.
- Rouard, H., Leon, A., Klonjowski, B., Marquet, J., Tenneze, L., Plonquet, A., Agrawal, S.G., Abastado, J.P., Eloit, M., Farcet, J.P. & Delfau Larue, M.H. (2000). Adenoviral transduction of human 'clinical grade' immature dendritic cells enhances costimulatory molecule expression and T-cell stimulatory capacity. *J Immunol Methods* **241**, 69-81.
- Rubartelli, A., Poggi, A. & Zocchi, M.R. (1997). The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the alpha(v)beta3 integrin and requires intracellular and extracellular calcium. *Eur J Immunol* **27**, 1893-1900.
- Sakahira, H., Enari, M. & Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**, 96-99.
- Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. (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**, 1109-1118.
- Sauter, B., Albert, M.L., Francisco, L., Larsson, M., Somersan, S. & Bhardwaj, N. (2000). Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* **191**, 423-434.
- Savill, J. & Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* **407**, 784-788.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.-M., Krammer, P.H. & Peter, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* **17**, 1675-1687.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P.H. & Peter, M.E. (1999). The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* **274**, 1541-1548.
- Scandella, E., Men, Y., Gillessen, S., Forster, R. & Groettrup, M. (2002). Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **100**, 1354-1361.

- Scheinecker, C., Machold, K.P., Majdic, O., Hocker, P., Knapp, W. & Smolen, J.S. (1998). Initiation of the autologous mixed lymphocyte reaction requires the expression of costimulatory molecules B7-1 and B7-2 on human peripheral blood dendritic cells. *J Immunol* **161**, 3966-3973.
- Schimpl, A., Berberich, I., Kneitz, B., Kramer, S., Santner-Nanan, B., Wagner, S., Wolf, M. & Hunig, T. (2002). IL-2 and autoimmune disease. *Cytokine Growth Factor Rev* **13**, 369-378.
- Schlienger, K., Craighead, N., Lee, K.P., Levine, B.L. & June, C.H. (2000). Efficient priming of protein antigen-specific human CD4(+) T cells by monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **96**, 3490-3498.
- Schmitt, J. (2003). Recombinant autoantigens for diagnosis and therapy of autoimmune diseases. *Biomed Pharmacother* **57**, 261-268.
- Schmitz, I., Krueger, A., Baumann, S., Schulze-Bergkamen, H., Krammer, P.H. & Kirchhoff, S. (2003). An IL-2-dependent switch between CD95 signaling pathways sensitizes primary human T cells toward CD95-mediated activation-induced cell death. *J Immunol* **171**, 2930-2936.
- Schneider, P., Bodmer, J.-L., Holler, N., Mattmann, C., Scuderi, P., Terskikh, A., Peitsch, M.C. & Tschopp, J. (1997). Characterization of Fas (Apo-1, CD95)-Fas ligand interaction. *J Biol Chem* **272**, 18827-18833.
- Schneider, P., Holler, N., Bodmer, J.L., Hahne, M., Frei, K., Fontana, A. & Tschopp, J. (1998). Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med* **187**, 1205-1213.
- Schuler, G., Schuler-Thurner, B. & Steinman, R.M. (2003). The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* **15**, 138-147.
- Schulze Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S. & Peter, M.E. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* **254**, 439-459.
- Schwartz, R.H. (2003). T cell anergy. *Annu Rev Immunol* **21**, 305-334.
- Seino, K., Iwabuchi, K., Kayagaki, N., Miyata, R., Nagaoka, I., Matsuzawa, A., Fukao, K., Yagita, H. & Okumura, K. (1998). Chemotactic activity of soluble Fas ligand against phagocytes. *J Immunol* **161**, 4484-4488.
- Sharpe, A.H. & Freeman, G.J. (2002). The B7-CD28 superfamily. *Nature Rev Immunol* **2**, 116-126.
- Shen, Z., Reznikoff, G., Dranoff, G. & Rock, K. (1997). Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J Immunol* **158**, 2723-2730.
- Shevach, E.M. (2001). Certified professionals: CD4(+)CD25(+) suppressor T cells. *J Exp Med* **193**, F41-46.
- Shisler, J., Yang, C., Walter, B., Ware, C. & Gooding, L. (1997). The adenovirus E3-10.4K/14.5K complex mediates loss of cell surface Fas (CD95) and resistance to Fas-induced apoptosis. *J Virol* **71**, 8299-8306.
- Shortman, K. & Liu, Y.J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Rev Immunol* **2**, 151-161.

- Shounan, Y., Feng, X. & O'Connell, P.J. (1998). Apoptosis detection by annexin V binding: a novel method for the quantitation of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* **217**, 61-70.
- Smith, C., Woodruff, L., Kitchingman, G. & Rooney, C. (1996). Adenovirus-pulsed dendritic cells stimulate human virus-specific T-cell responses in vitro. *J Virol* **70**, 6733-6740.
- Sonderbye, L., Feng, S., Yacoubian, S., Buehler, H., Ahsan, N., Mulligan, R. & Langhoff, E. (1998). In vivo and in vitro modulation of immune stimulatory capacity of primary dendritic cells by adenovirus-mediated gene transduction. *Exp Clin Immunogenet* **15**, 100-111.
- Song, K., Chen, Y., Goke, R., Wilmen, A., Seidel, C., Goke, A. & Hilliard, B. (2000). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression. *J Exp Med* **191**, 1095-1104.
- Sprent, J. & Surh, C.D. (2002). T cell memory. *Annu Rev Immunol* **20**, 551-579.
- St. George, J.A. (2003). Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors. *Gene Ther* **10**, 1135-1141.
- Steinbrink, K., Jonuleit, H., Muller, G., Schuler, G., Knop, J. & Enk, A.H. (1999). Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* **93**, 1634-1642.
- Steinbrink, K., Paragnik, L., Jonuleit, H., Tüting, T., Knop, J. & Enk, A.H. (2000). Induction of dendritic cell maturation and modulation of dendritic cell-induced immune responses by prostaglandins. *Arch Dermatol Res* **292**, 437-445.
- Steinbrink, K., Graulich, E., Kubsch, S., Knop, J. & Enk, A.H. (2002). CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* **99**, 2468-2476.
- Steinman, R.M., Turley, S., Mellman, I. & Inaba, K. (2000). The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* **191**, 411-416.
- Steinman, R.M. & Nussenzweig, M.C. (2002). Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *PNAS* **99**, 351-358.
- Strauss, G., Knape, I., Melzner, I. & Debatin, K.-M. (2003). Constitutive caspase activation and impaired death-inducing signaling complex formation in CD95-resistant, long-term activated, antigen-specific T cells. *J Immunol* **171**, 1172-1182.
- Su, X., Cheng, J., Liu, W., Liu, C., Wang, Z., Yang, P., Zhou, T. & Mountz, J.D. (1998). Autocrine and paracrine apoptosis are mediated by differential regulation of Fas ligand activity in two distinct Jurkat T cell populations. *J Immunol* **160**, 5288-5293.
- Suda, T., Hashimoto, H., Tanaka, M., Ochi, T. & Nagata, S. (1997). Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J Exp Med* **186**, 2045-2050.
- Suda, T., Tanaka, M., Miwa, K. & Nagata, S. (1996). Apoptosis of mouse naive T cells induced by recombinant soluble Fas ligand and activation-induced resistance to Fas ligand. *J Immunol* **157**, 3918-3924.
- Süss, G. & Shortman, K. (1996). A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand- induced apoptosis. *J Exp Med* **183**, 1789-1796.

- Svane, I.M., Soot, M.L., Buus, S. & Johnsen, H.E. (2003). Clinical application of dendritic cells in cancer vaccination therapy. *APMIS* **111**, 818-834.
- Sweetser, M., Braciale, V. & Braciale, T. (1988). Class I MHC-restricted recognition of cells expressing a gene encoding a 41 amino acid product of the influenza hemagglutinin. *J Immunol* **141**, 3324-3328.
- Swenson, K.M., Ke, B., Wang, T., Markowitz, J.S., Maggard, M.A., Spear, G.S., Imagawa, D.K., Goss, J.A., Busuttil, R.W. & Seu, P. (1998). Fas ligand gene transfer to renal allografts in rats: effects on allograft survival. *Transplantation* **65**, 155-160.
- Szabolcs, P., Park, K.-D., Reese, M., Marti, L., Broadwater, G. & Kurtzberg, J. (2003). Absolute values of dendritic cell subsets in bone marrow, cord blood, and peripheral blood enumerated by a novel method. *Stem Cells* **21**, 296-303.
- Takayama, T., Morelli, A.E., Robbins, P.D., Tahara, H. & Thomson, A.W. (2000). Feasibility of CTLA4Ig gene delivery and expression in vivo using retrovirally transduced myeloid dendritic cells that induce alloantigen-specific T cell anergy in vitro. *Gene Ther* **7**, 1265-1273.
- Takeuchi, T., Ueki, T., Nishimatsu, H., Kajiwara, T., Ishida, T., Jishage, K.-i., Ueda, O., Suzuki, H., Li, B., Moriyama, N. & Kitamura, T. (1999). Accelerated rejection of FAS ligand-expressing heart grafts. *J Immunol* **162**, 518-522.
- Tanaka, M., Suda, T., Takahashi, T. & Nagata, S. (1995). Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J.* **14**, 1129-1135.
- Tanaka, M., Suda, T., Haze, K., Nakamura, N., Sato, K., Kimura, F., Motoyoshi, K., Mizuki, M., Tagawa, S., Ohga, S., Hatake, K., Drummond, A.H. & Nagata, S. (1996). Fas ligand in human serum. *Nat Med* **2**, 317-322.
- Tanaka, M., Itai, T., Adachi, M. & Nagata, S. (1998). Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med* **4**, 31-36.
- Tanchot, C., Rosado, M.M., Agenes, F., Freitas, A.A. & Rocha, B. (1997). Lymphocyte homeostasis. *Semin Immunol* **9**, 331-337.
- Turner, I.H., Nakajima, A., Seroogy, C.M., Ermann, J., Levicnik, A., Contag, C.H. & Fathman, C.G. (2002). Retroviral gene therapy of collagen-induced arthritis by local delivery of IL-4. *Clin Immunol* **105**, 304-314.
- Thellin, O., Coumans, B., Zorzi, W., Igout, A. & Heinen, E. (2000). Tolerance to the foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months. *Curr Opin Immunol* **12**, 731-737.
- Tibbetts, M.D., Zheng, L. & Lenardo, M.J. (2003). The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis. *Nat Immunol* **4**, 404-409.
- Tillman, B.W., de Gruijl, T.D., Luykx de Bakker, S.A., Scheper, R.J., Pinedo, H.M., Curiel, T.J., Gerritsen, W.R. & Curiel, D.T. (1999). Maturation of dendritic cells accompanies high-efficiency gene transfer by a CD40-targeted adenoviral vector. *J Immunol* **162**, 6378-6383.
- Toungouz, M., Donckier, V. & Goldman, M. (2003). Tolerance induction in clinical transplantation: the pending questions. *Transplantation* **75**, 58S-60S.
- Tschopp, J., Irmeler, M. & Thome, M. (1998). Inhibition of Fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol* **10**, 552-558.

- Turley, S.J. (2002). Dendritic cells: inciting and inhibiting autoimmunity. *Curr Opin Immunol* **14**, 765-770.
- Van Parijs, L., Refaeli, Y., Lord, J.D., Nelson, B.H., Abbas, A.K. & Baltimore, D. (1999). Uncoupling IL-2 signals that regulate T cell proliferation, survival, and Fas-mediated activation-induced cell death. *Immunity* **11**, 281-288.
- Varadhachary, A.S., Perdow, S.N., Hu, C., Ramanarayanan, M. & Salgame, P. (1997). Differential ability of T cell subsets to undergo activation-induced cell death. *PNAS* **94**, 5778-5783.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens Nakken, H. & Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* **184**, 39-51.
- Vermes, I., Haanen, C. & Reutelingsperger, C. (2000). Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* **243**, 167-190.
- Vidalain, P.O., Azocar, O., Yagita, H., Roubourdin Combe, C. & Servet Delprat, C. (2001). Cytotoxic activity of human dendritic cells is differentially regulated by double-stranded RNA and CD40 ligand. *J Immunol* **167**, 3765-3772.
- Viglietta, V., Kent, S.C., Orban, T. & Hafler, D.A. (2002). GAD65-reactive T cells are activated in patients with autoimmune type 1a diabetes. *J Clin Invest* **109**, 895-903.
- Voll, R.E., Herrmann, M., Roth, E.A., Stach, C., Kalden, J.R. & Girkontaite, I. (1997). Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* **390**, 350-351.
- Vorburger, S.A. & Hunt, K.K. (2002). Adenoviral gene therapy. *Oncologist* **7**, 46-59.
- Walczak, H. & Krammer, P.H. (2000). The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* **256**, 58-66.
- Wallach, D., Varfolomeev, E.E., Malinin, N.L., Goltsev, Y.V., Kovalenko, A.V. & Boldin, M.P. (1999). Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* **17**, 331-367.
- Wanstrat, A. & Wakeland, E. (2001). The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes. *Nat Immunol* **2**, 802-809.
- Watts, C. (1997). Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol* **15**, 821-850.
- Watzlik, A., Dufter, C., Jung, M., Opelz, G. & Terness, P. (2000). Fas ligand gene-carrying adeno-5 AdEasy viruses can be efficiently propagated in apoptosis-sensitive human embryonic retinoblast 911 cells. *Gene Ther* **7**, 70-74.
- Watzlik, A., Dufter, C., Jung, M., Opelz, G. & Terness, P. (2001). Generation of FASL-expressing antigen-presenting cells for suppression of alloreactive T cells in the rat. *Transplant Proc* **33**, 599-601.
- Weis, M., Schlegel, J., Kass, G.E., Holmstrom, T.H., Peters, I., Eriksson, J., Orrenius, S. & Chow, S.C. (1995). Cellular events in Fas/APO-1-mediated apoptosis in JURKAT T lymphocytes. *Exp Cell Res* **219**, 699-708.
- Whartenby, K.A., Straley, E.E., Kim, H., Racke, F., Tanavde, V., Gorski, K.S., Cheng, L., Pardoll, D.M. & Civin, C.I. (2002). Transduction of donor hematopoietic stem-progenitor cells with Fas ligand enhanced short-term engraftment in a murine model of allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **100**, 3147-3154.

- Willems, F., Amraoui, Z., Vanderheyde, N., Verhasselt, V., Aksoy, E., Scaffidi, C., Peter, M.E., Krammer, P.H. & Goldman, M. (2000). Expression of c-FLIP(L) and resistance to CD95-mediated apoptosis of monocyte-derived dendritic cells: inhibition by bisindolylmaleimide. *Blood* **95**, 3478-3482.
- Wolfe, T., Asseman, C., Hughes, A., Matsue, H., Takashima, A. & von Herrath, M.G. (2002). Reduction of antiviral CD8 lymphocytes in vivo with dendritic cells expressing Fas ligand--increased survival of viral (lymphocytic Choriomeningitis Virus) central nervous system infection. *J Immunol* **169**, 4867-4872.
- Wong, B., Arron, J. & Choi, Y. (1997). T cell receptor signals enhance susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *J Exp Med* **186**, 1939-1944.
- Wu, B., Wu, J.M., Miagkov, A., Adams, R.N., Levitsky, H.I. & Drachman, D.B. (2001). Specific immunotherapy by genetically engineered APCs: the "guided missile" strategy. *J Immunol* **166**, 4773-4779.
- Yang, B.-C., Lin, H.-K., Hor, W.-S., Hwang, J.-Y., Lin, Y.-P., Liu, M.-Y. & Wang, Y.-J. (2003). Mediation of enhanced transcription of the IL-10 gene in T cells, upon contact with human glioma cells, by Fas signaling through a protein Kinase A-independent pathway. *J Immunol* **171**, 3947-3954.
- Yolcu, E.S., Askenasy, N., Singh, N.P., Cherradi, S.E. & Shirwan, H. (2002). Cell membrane modification for rapid display of proteins as a novel means of immunomodulation: FasL-decorated cells prevent islet graft rejection. *Immunity* **17**, 795-808.
- Yonehara, S., Ishii, A. & Yonehara, M. (1989). A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* **169**, 1747-1756.
- Yoshimura, S., Bondeson, J., Foxwell, B.M., Brennan, F.M. & Feldmann, M. (2001). Effective antigen presentation by dendritic cells is NF-kappaB dependent: coordinate regulation of MHC, co-stimulatory molecules and cytokines. *International Immunology* **13**, 675-683.
- Zandman-Goddard, G. & Shoenfeld, Y. (2002). HIV and autoimmunity. *Autoimmun Rev* **1**, 329-337.
- Zhang, H., Yang, Y., Horton, J.L., Samoilova, E.B., Judge, T.A., Turka, L.A., Wilson, J.M. & Chen, Y. (1997). Amelioration of collagen-induced arthritis by CD95 (Apo-1/Fas)-ligand gene transfer. *J Clin Invest* **100**, 1951-1957.
- Zhang, H-G., Bilbao, G., Zhou, T., Contreras, J.L., Gomez Navarro, J., Feng, M., Saito, I., Mountz, J.D. & Curiel, D.T. (1998). Application of a Fas ligand encoding a recombinant adenovirus vector for prolongation of transgene expression. *J Virol* **72**, 2483-2490.
- Zhang, H-G., Su, X., Liu, D., Liu, W., Yang, P., Wang, Z., Edwards, C.K., Bluethmann, H., Mountz, J.D. & Zhou, T. (1999). Induction of specific T cell tolerance by Fas ligand-expressing antigen-presenting cells. *J Immunol* **162**, 1423-1430.
- Zhang, H-G., Fleck, M., Kern, E.R., Liu, D., Wang, Y., Hsu, H.C., Yang, P., Wang, Z., Curiel, D.T., Zhou, T. & Mountz, J.D. (2000). Antigen presenting cells expressing Fas ligand down-modulate chronic inflammatory disease in Fas ligand-deficient mice. *J Clin Invest* **105**, 813-821.
- Zhang, L., Miller, R. & Zhang, J. (1996). Characterization of apoptosis-resistant antigen-specific T cells in vivo. *J Exp Med* **183**, 2065-2073.

- Zhong, L., Granelli Piperno, A., Choi, Y. & Steinman, R.M. (1999). Recombinant adenovirus is an efficient and non-perturbing genetic vector for human dendritic cells. *Eur J Immunol* **29**, 964-972.
- Zhou, L.J. & Tedder, T.F. (1996). CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *PNAS* **93**, 2588-2592.

VI Zusammenfassung

Die Aktivierung auto- oder alloreaktiver T-Zellen durch DC gilt als wesentlicher pathogenetischer Schritt zahlreicher Autoimmunerkrankungen bzw. Transplantat-Abstoßungsreaktionen. Die Therapieoptionen bei diesen T-zellabhängigen Erkrankungen beschränken sich bisher auf die Gabe von unspezifisch wirkenden Immunsuppressiva, die das Immunsystem generell unterdrücken und deshalb zum Teil schwere Nebenwirkungen wie opportunistische Infektionen oder Tumorerkrankungen verursachen können. Wünschenswert wäre dagegen die selektive Ausschaltung reaktiver T-Lymphozyten, d. h. die Induktion einer antigenspezifischen T-Zelltoleranz. In zahlreichen Tiermodellen und *in vitro* Experimenten mit Zelllinien konnte gezeigt werden, dass der Einsatz Fas Ligand- (FasL- oder CD95L-) exprimierender antigenpräsentierender Zellen (APC-FasL) eine vielversprechende Therapieoption darstellt. Ähnliche Untersuchungen mit primären humanen APC-FasL wurden bisher jedoch noch nicht durchgeführt. Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb die Generierung humaner FasL-exprimierender APC durch adenoviralen Gentransfer und die Analyse der immunregulatorischen Funktionen dieser Zellen. Hierzu wurden DC aus primären humanen Monozyten *in vitro* differenziert und in Kokultivierungsexperimenten mit T-Lymphozyten eingesetzt. Wegen der schlechten Vermehrungseffizienz adenoviraler Vektoren, die apoptoseinduzierende Gene kodieren, wurden Vektorkonstrukte verwendet, die eine induzierbare FasL-Expression unter Kontrolle des Cre/loxP-Vektorsystems ermöglichten. Durch die Expression des FasL-Gens wurden unreife DC durch Fas-vermittelte Apoptose ausgeschaltet, während reife DC (mDC) davor geschützt waren. Die adenovirale Transduktion der DC mit dem Kontrollvektor AdEGFP oder mit FasL (mDC-FasL) verursachte keine Änderung des DC-Phänotyps. Die Funktionalität der mDC-FasL wurde in verschiedenen Kokultivierungsmodellen mit T-Zellen getestet. Zunächst wurden Fas-exprimierende Jurkat T-Zellen verwendet, die durch mDC-FasL besonders effizient eliminiert werden konnten. Die Apoptoseinduktion war abhängig vom Zellkontakt und konnte durch einen FasL-blockierenden Antikörper konzentrationsabhängig unterbunden werden. Untersuchungen mit primären humanen T-Lymphozyten zeigten, dass diese erst nach Aktivierung durch mDC-FasL eliminiert werden konnten, während ruhende T-Lymphozyten vor dem Apoptosesignal geschützt waren. Dabei wurde in polyklonal aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gleichermaßen Apoptose induziert. In einem allogenen Stimulationsmodell wurde gezeigt, dass mDC-FasL ebenfalls allogene aktivierte T-Zellen effizient eliminieren konnten. Ein Ausblick auf weitere Untersuchungen von mDC-FasL in einem autologen System zur

antigenspezifischen Deletion T-Lymphozyten wurde dargestellt und die Vorteile und Risiken des Einsatzes von mDC-FasL als potenzielle Therapieoption T-zellabhängiger Erkrankungen diskutiert.

VII Summary

Several *in vitro* and animal studies have been performed in order to modulate the interaction of antigen presenting cells (APC) and T lymphocytes by Fas signaling to delete activated T cells in an antigenspecific manner. These studies support the concept to apply Fas ligand (FasL) expressing APC (APC-FasL) as a novel strategy for the treatment of T cell dependent autoimmune disease and allograft rejection. However, comparable studies with human APC-FasL are still lacking. Due to difficulties in propagation of vectors carrying suicide genes, an inducible Cre/loxP adenovirus vector system was used for transduction of monocyte-derived human dendritic cells (DC) to express FasL. Transduction of immature DC with FasL resulted in massive self destruction, while mature DC (mDC) were protected from Fas-mediated apoptosis despite expression of Fas and could be used for further studies. Transduction of mDC with the control vector AdEGFP or with FasL (mDC-FasL) did not affect the characteristic mature DC phenotype. Functional analysis of mDC-FasL was studied in different coculture models using T cells. First, experiments with the Fas⁺ Jurkat T cell line were performed revealing that mDC-FasL were able to eliminate Jurkat T cells very efficiently, which was due to induction of apoptosis. Apoptosis in Fas⁺ target cells required cell-to-cell contact with APC-FasL and could be inhibited by a blocking anti-FasL antibody in a dose dependent fashion. Using primary human T lymphocytes in a second coculture model, it could be demonstrated that only activated but not resting T cells were eliminated by Fas-mediated apoptosis. Activated primary human CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes could be equally eliminated by mDC-FasL. In addition, allogeneic activated T cells were also killed by mDC-FasL. In addition, future studies using an autologous coculture model to analyze elimination of T lymphocytes in an antigenspecific manner by mDC-FasL were presented. Advantages of DC-FasL in immunotherapy of T cell-dependent diseases and the possible risks were discussed.

VIII Anhang

VIII.1 Medien, Puffer und Lösungen

Annexin V-Bindungspuffer	10 ml	1M HEPES (Sigma)
	8,12 g	NaCl (Merck)
	0,28 g	CaCl ₂ (Merck)
		ad 1000 ml Aqua bidest.
Cäsiumchlorid Lösung „light stock“ mit 1,2 g/ml	11,2 g	CsCl ₂ (Sigma) mit 1x VSB auf 50g auffüllen
Cäsiumchlorid Lösung „heavy stock“ mit 1,46 g/ml	21,1 g	CsCl ₂ (Sigma) mit 1x VSB auf 50g auffüllen
CellGro	500 ml	CellGro DC Medium (CellGenix)
	5 ml	10 ⁴ U bzw. 10 mg/ml Penicillin/Streptomycin (PAA)
DMEM-komplett	500 ml	DMEM mit L-Glutamin (high Glucose, PAA)
	50 ml	FCS (PAA)
	5 ml	10 ⁴ U bzw. 10 mg/ml Penicillin/Streptomycin (PAA)
	0,5 ml	1 mg/ml Amphotericin B (Sigma)
DMEM mit 2% FCS	490 ml	DMEM (4,5 g/l Glucose, PAA)
	10 ml	FCS (PAA)
FACS-Fixativ	500 ml	PBS (PAN)
	50 ml	Paraformaldehyd (10% in PBS, w/v, Sigma)
FACS-Waschpuffer	500 ml	PBS (PAN)
	50 ml	FCS (PAA)
	5,5 ml	NaN ₃ (10% in PBS, w/v, Sigma)

Lagerungspuffer für Adenoviren	50 ml	Glycerin 50% (Merck)
	0,1 g	BSA (PAA)
	0,121 g	Tris (Merck)
	0,584 g	NaCl (Merck)
	0,0203 g	MgCl ₂ (Sigma)
MACS-Puffer	50 ml	PBS (PAN)
	250 µl	T-zellautologes Plasma (II.1.1.4)
	200 µl	0,5 M EDTA pH 7,4, (in Aqua bidest., Merck)
RPMI-minus	500 ml	RPMI 1640 ohne L-Glutamin (Bio Whittaker)
	5 ml	L-Glutamin 200mM (100x, GibcoBRL)
	5 ml	Natriumpyruvat 100mM (100x, GibcoBRL)
	5 ml	nicht essentielle Aminosäuren (100x, GibcoBRL)
	5 ml	10 ⁴ U bzw. 10 mg/ml Penicillin/Streptomycin (PAA)
	2 ml	MEM Vitamine (100x, GibcoBRL)
	1 ml	β-Mercaptoethanol (0,2% in PBS, Amresco)
RPMI-komplett	500 ml	RPMI mit L-Glutamin (4,5 g/l Glucose, PAN)
	50 ml	FCS (PAA)
	5 ml	10 ⁴ U bzw. 10 mg/ml Penicillin/Streptomycin (PAA)
	0,5 ml	Amphotericin B (1 mg/ml, Sigma)
50 x TAE-Puffer	242 g	Tris (Merck)
	57,1 ml	Eisessig (Merck)
	16,6 g	EDTA (Merck)
		ad 1000 ml Aqua bidest., pH 8
10 x VSB	80 g	NaCl (Merck)
	3,72 g	KCl (Merck)
	100 ml	1M Tris pH 7,4 (Merck)
	2,0 g	MgCl ₂ * 6 H ₂ O (Sigma)
		ad 1000 ml Aqua bidest., pH 7,4

VIII.2 Anbieterverzeichnis

Amersham Pharmacia	Erlangen, Deutschland
Amresco	Solon, OH, USA
Baxter	Unterschleißheim, Deutschland
Beckman Coulter	Palo Alto, CA, USAf
Becton Dickinson	Heidelberg, Deutschland
Binder	Tuttlingen, Deutschland
Bio Whittaker Europe	Verviers, Belgien
BMA	Rockland, USA
Calbiochem	La Jolla, CA, USA
Caltag Laboratories	Hamburg, Deutschland
CellGenix	Freiburg, Deutschland
Clontech	Heidelberg, Deutschland
Coulter Corporation	Miami, FL, USA
Coulter Electronics Inc.	Miami, FL, USA
DSMZ	Braunschweig, Germany
eBioscience	San Diego, CA, USA
Embi Tec	San Diego, CA, USA
Essex	München, Deutschland
Falcon	BD, Heidelberg, Deutschland
FCM Bioproducts	Rockland, USA
Gibco Invitrogen Corporation	Karlsruhe, Deutschland
Immunex	Amgen GmbH, München, Deutschland
Immunotech	Marseilles, Frankreich
Innotech	Dottikon, Schweiz
Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Kendro	Hanau, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
Molecular Probes	Leiden; Niederlande
Nunc	Roskilde, Dänemark
PAA	Linz, Österreich
PAN	Aidenbach, Deutschland
PE Applied Biosystems	Foster City, USA

Perkin Elmer	Rodgau - Jügesheim, Deutschland
Pharmacia & Upjohn	Erlangen, Deutschland
Pharmingen	San Diego, CA, USA
Pierce	Rockfort, IL, USA
Promocell	Heidelberg, Deutschland
Qiagen	Hilden, Deutschland
Quantum Technologies	Irvine, CA, USA
R & D Systems	Wiesbaden, Deutschland
Roche Diagnostics	Mannheim, Deutschland
Sigma	Deisenhof, Deutschland
Trinova Biochem	Gießen, Deutschland
Upstate	Charlottesville, VA, USA
Wallac Oy	Turku, Finnland
Wallac UK	Milton Keynes, Großbritannien
Zeiss	Göttingen, Deutschland

IX Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden aus Prioritätsgründen bereits veröffentlicht oder zur Publikation eingereicht:

Hoves, S. Niller, H. H., Krause, S. W., Straub, R., Glück, T., Mountz, J. D., Schölmerich, J., and Fleck, M. (2001). Decreased T cell stimulatory capacity of monocyte-derived human macrophages following herpes simplex virus type 1 infection. *Scand J Immunol*, **54** (1-2): 93-99.

Hoves, S., Krause, S. W., Halbritter, D., Zhang, H.-G., Mountz, J. D., Schölmerich, J., and Fleck, M. (2003). Mature but not immature Fas Ligand (CD95L)-transduced human monocyte-derived dendritic cells are protected from Fas-mediated apoptosis and can be used as "Killer-APC". *J Immunol*, **170**: 5406-5413.

Hoves, S., Krause, S. W., Schölmerich, J., and Fleck, M. (2003). The JAM-Assay: Optimized conditions to determine death-receptor-mediated apoptosis. *Methods*, **31**: 127-134.

Hoves, S., Krause, S. W., Herfarth, H., Halbritter, D., Zhang, H.-G., Mountz, J. D., Schölmerich, J; and Fleck, M. Elimination of Activated but not Resting Primary Human CD4⁺ and CD8⁺ T Cells by Fas Ligand (FasL/CD95L)-expressing Killer-Dendritic Cells. *Eingereicht*.

Bedanken möchte ich mich bei....

- ... PD Dr. Martin Fleck für das in mich gesetzte Vertrauen und die Betreuung dieser Arbeit, was verbunden war mit immerwährendem Interesse an *high quality data* sowie großer Begeisterung über gelungene Experimente.
- ... Prof. Dr. Jürgen Schölmerich für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Abteilung für Innere Medizin I anfertigen und auf internationalen Kongressen präsentieren zu können.
- ... Prof. Dr. Charalalomos Aslanidis für die Bereitschaft, die fakultätsinterne Vertretung und Betreuung dieser Arbeit zu übernehmen.
- ... PD Dr. Stefan Krause, Prof. Dr. Andreas Mackensen, PD Dr. Marina Kreuz und ihren Mitarbeitern in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie für Rat und Tat bei den ersten Schritten der DC- und T-Zell-Kunde.
- ... Huang-Ge Zhang und John. D. Mountz für die Überlassung der adenoviralen Vektoren AxCANCre und AdloxPFasL.
- ... Prof. Dr. Werner Falk, Prof. Dr. Rainer Straub und Prof. Dr. Caspar Frantzen für konstruktive Anmerkungen in den Forschungsbau-Seminaren.
- ... PD Dr. Ulf Müller-Ladner für die freundliche Aufnahme in die rheumatologische Arbeitsgruppe.
- ... Dagmar Halbritter für die produktive Zusammenarbeit in unserer kleinen Arbeitsgruppe und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre in den letzten Jahren.
- ... allen tapferen (Ex-)Kämpfern aus Raum 28 Angela, Birgit, Dagmar, Elena, Gabi F., Gabi K., Gisela, Ingo, Martin, Olga, Sandra und Wibke für ausreichend Ablenkung zwischen Sterilbank und FACS.
- ... meiner Schwester Beate für ein stets offenes Ohr in allen Lebenslagen, auch wenn sie so weit von mir entfernt wohnt.
- ... meinen Eltern für ihre finanzielle und moralische Unterstützung in all den langen Jahren meines Werdegangs.
- ... Stefan für die Geduld und das Verständnis, wenn die gemeinsamen Wochenende immer wieder von Laboraufenthalten unterbrochen wurden, sowie für die beharrliche Unterweisung in die Feinheiten der deutschen Sprache ...wüps!

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, Dezember 2003

Sabine Hoves