

Interaktionen von dendritischen Zellen und Effektorzellen der frühen antitumoralen Immunabwehr

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften

der Technischen Universität Dresden

von

Rebekka Wehner

Dresden

2008

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Günther Vollmer
(Institut für Zoologie, Technische Universität Dresden)
PD Dr. med. Marc Schmitz
(Institut für Immunologie, Technische Universität Dresden)
Prof. Dr. med. Hinrich Abken
(Klinik I für Innere Medizin, Klinikum der Universität zu Köln)

Aus aktuellen Gründen wurden Teile dieser Arbeit bereits präsentiert:

Veröffentlichung:

R. Wehner, B. Löbel, M. Bornhäuser, K. Schäkel, M. Bachmann, E. P. Rieber, M. Schmitz
“Reciprocal interaction between 6-sulfo LacNAc⁺ dendritic cells and NK cells”
Manuskript eingereicht

Poster:

R. Wehner, B. Löbel, M. Bornhäuser, E. P. Rieber, M. Schmitz
“Reciprocal interaction between native human blood dendritic cells and NK cells in
antitumor immunity”
37. Annual Meeting of the German Society for Immunology, 5.-8. September 2007,
Heidelberg

Vortrag:

R. Wehner, B. Löbel, M. Bornhäuser, E. P. Rieber, M. Schmitz
“Reciprocal interaction between native human blood dendritic cells and NK cells in
antitumor immunity”
Tagung des Arbeitskreises Tumorimmunologie im Rahmen des 37. Annual Meeting of the
German Society for Immunology, 5. September 2007, Heidelberg

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.2	Dendritische Zellen	2
1.2.1	Aufgaben und Funktionen dendritischer Zellen.....	2
1.2.2	Subpopulationen humaner dendritischer Zellen im Blut.....	5
1.2.3	Tumortheraeutische Strategien auf der Basis dendritischer Zellen.....	7
1.3	Natürliche „Killer“-Zellen.....	9
1.3.1	Aufgaben und Funktionen von NK-Zellen	9
1.3.2	Aktivierende und inhibierende NK-Zell-Rezeptoren	10
1.3.3	NK-Zellen als Effektorzellen gegen Tumoren.....	12
1.4	Interaktionen von NK-Zellen und dendritischen Zellen	14
1.5	Natürliche „Killer“-T (NKT)-Zellen.....	14
1.6	Zielstellung	16
2	Material und Methoden	18
2.1	Material	18
2.1.1	Chemikalien.....	18
2.1.2	Lösungen und Puffer	20
2.1.3	Testkitsysteme	22
2.1.4	Grundmedien und Medienzusätze	22
2.1.5	Medienzusammensetzung	24
2.1.6	Humane Tumorzellen	24
2.1.7	Antikörper und Antikörper-gekoppelte „microbeads“	25
2.1.8	Geräte	28
2.1.9	Sonstige Materialien.....	28
2.2	Methoden	30
2.2.1	Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes	30
2.2.2	Isolation von 6-sulfo LacNAc ⁺ dendritischen Zellen	30
2.2.3	Isolation von CD56 ⁺ CD3 ⁻ NK-Zellen und naiven CD4 ⁺ T-Lymphozyten	31
2.2.4	Isolation von CD56 ⁺ CD3 ⁺ NKT-Zellen	31
2.2.5	Kultivierung der CML-Zelllinie K562	32
2.2.6	Kultivierung von AML-Blasten	32
2.2.7	Durchflusszytometrie.....	33
2.2.8	„Enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA).....	35

2.2.9	Proliferationstest mit [methyl,1',2'- ³ H]-Thymidin	37
2.2.10	Chromfreisetzungstest	37
2.2.11	Programmierung naiver CD4 ⁺ T-Lymphozyten	38
2.2.12	Statistik.....	39
3	Ergebnisse.....	40
3.1	Analyse des Einflusses von slanDCs auf NK-Zellen.....	40
3.1.1	Wirkung von slanDCs auf die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf NK-Zellen	40
3.1.2	Einfluss von slanDCs auf das Proliferationsverhalten von NK-Zellen	42
3.1.3	Modulation der Expression aktivierender Rezeptoren auf NK-Zellen durch slanDCs.....	43
3.1.4	Wirkung von slanDCs auf die IFN- γ -Produktion von NK-Zellen	51
3.1.5	Modulation der Tumor-gerichteten Zytotoxizität von NK-Zellen durch slanDCs.....	53
3.2	Charakterisierung der Wirkung von NK-Zellen auf slanDCs	56
3.2.1	Einfluss von NK-Zellen auf die Vitalität von slanDCs	56
3.2.2	Beeinflussung der Maturierung von slanDCs durch NK-Zellen	58
3.2.3	Modulation der Zytokinsekretion von slanDCs durch NK-Zellen	63
3.2.4	Modifikation der slanDC-vermittelten Programmierung von CD4 ⁺ T-Lymphozyten durch Interaktionen mit NK-Zellen	66
3.3	Evaluation der Interaktionen von slanDCs und NKT-Zellen.....	69
3.3.1	Wirkung von slanDCs auf die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf NKT-Zellen	69
3.3.2	Modulation des Zytokinprofils von NKT-Zellen durch slanDCs	71
3.3.3	Beeinflussung der Maturierung von slanDCs durch NKT-Zellen.....	74
3.3.4	Modifikation des Zytokinprofils von slanDCs durch NKT-Zellen.....	79
4	Diskussion	82
4.1	Dendritische Zellen als Aktivatoren einer spezifischen T-Zell-Antwort	82
4.2	Aktivierung von NK-Zellen durch dendritische Zellen	83
4.2.1	Wirkung von dendritischen Zellen auf den Phänotyp von NK-Zellen	83
4.2.2	Beeinflussung der Zytokinproduktion und der Zytotoxizität von NK-Zellen durch dendritische Zellen	85
4.2.3	Zugrunde liegende Mechanismen der Aktivierung von NK-Zellen durch dendritische Zellen	86

4.3	Modulation der immunstimulatorischen Eigenschaften dendritischer Zellen durch NK-Zellen	87
4.4	Wechselwirkungen von NKT-Zellen und dendritischen Zellen	90
4.5	Bedeutung dendritischer Zellen bei der Immunabwehr von Tumoren	93
5	Zusammenfassung	96
6	Literaturverzeichnis	99
	Versicherung	117
	Danksagung	118

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Amino-Actinomycin D
Abb.	Abbildung
ADCC	„antibody-dependent cellular cytotoxicity“ Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität
Ak	Antikörper
AML	Akute myeloische Leukämie
APCs	„antigen-presenting cells“ Antigen-präsentierende Zellen
bidest.	bidestillata
BSA	Bovines Serumalbumin
CCR	Chemokinrezeptor
CD	„cluster of differentiation“
CLIP	„class II-associated invariant chain peptide“
CML	Chronische myeloische Leukämie
CpG-DNA	Bakterielle nicht methylierte Cytosin-, Guanin-reiche DNA-Sequenzen
cpm	„counts per minute“
CTLs	„cytotoxic T lymphocytes“ Zytotoxische T-Lymphozyten
⁵¹ Cr	Chromium-51
DAP	„DNAX-activating protein“
DCs	„dendritic cells“ Dendritische Zellen
dest.	destillata
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„desoxyribonucleic acid“ Desoxyribonukleinsäure
DNAM	„DNAX accessory molecule“
EDTA	„ethylene diamine tetraacetic acid“ Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„enzym-linked immunosorbent assay“

ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	et alii
FACS	„fluorescence-activated cell sorter“ Durchflusszytometer
Fc	„fragment crystallizable“ Kristallisierbares Fragment der Antikörper
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
Flt3	„FMS-like tyrosine kinase“ 3
xg	Viefaches der Erdbeschleunigung
α -GalACer	„ α -galacturonosylceramide“
α -GalCer	„ α -galactosylceramide“
GM-CSF	„granulocyte-macrophage colony-stimulating factor“ Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
HS	Humanserum
ICAM	„intracellular adhesion molecule“
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITAM	„immunoreceptor tyrosine-based activation motif“
ITIM	„immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif“
KARAP	„killer cell activating receptor-associated protein“
kDa	Kilodalton
KIR	„killer cell immunoglobulin-like receptor“
LFA-1	„lymphocyte function-associated antigen“
li	„invariant chain“ Invariante Kette
LPS	Lipopolysaccharid
μ Ci	Mikrocurie
MACS	„magnetic cell sorter“ Magnetischer Zellseparator
mDCs	Myeloide dendritische Zellen
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität

MHC	„major histocompatibility complex“ Haupthistokompatibilitätskomplex
MIC	„MHC class I chain-related peptide“
MoDCs	Aus Monozyten generierte dendritische Zellen
mRNA	„messenger“ RNA
NCR	„natural cytotoxicity receptor“
NK-Zellen	Natürliche „Killer“-Zellen
PBMCs	„peripheral blood mononuclear cells“ Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	„phosphate buffered saline“ Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
pDCs	Plasmazytoide dendritische Zellen
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	Phycoerythrin-Cy5
polyI:C	Synthetische doppelsträngige Nukleinsäuresequenzen
PSGL-1	„P-selectin glycoprotein ligand-1“ P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1
pH	potentia Hydrogenii
PMA	Phorbol-12-Myristyl-13-Azetat
RNA	„ribonucleic acid“ Ribonukleinsäure
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute“
PVR	Polio-Virus-Rezeptor
RT	Raumtemperatur
SCF	„stem cell factor“ Stammzellfaktor
slan	6-sulfo LacNAc
TAA	„tumor-associated antigens“ Tumor-assoziierte Antigene
TAPs	„transporters associated with antigen processing“
Tab.	Tabelle
TCR	„T cell receptor“ T-Zell-Rezeptor
Th	T-Helferzelle

TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TLRs	„Toll-like receptors“
TRAIL	„TNF-related apoptosis-inducing ligand“
TSLP	„thymic stromal lymphopoietin“
³ H-Thymidin	[methyl,1',2'- ³ H]-Thymidin
ULBP-16	„unique long 16-binding proteins“
v	Volumen
VEGF-β	„Vascular endothelial growth factor-β“
w	„Weight“ Gewicht
z. B.	Zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Der menschliche Organismus ist ständig gesundheitlichen Gefahren seiner Umwelt ausgesetzt. Zum Schutz gegen Viren, Bakterien, Pilze, Parasiten und Tumorzellen hat sich das Immunsystem entwickelt. Seine löslichen und zellulären Komponenten werden einer angeborenen, natürlichen und einer erworbenen, adaptiven Form der Immunabwehr zugeordnet (Abbas *et al.*, 2003; Janeway *et al.*, 2005).

Die erste Verteidigungslinie bildet das natürliche Immunsystem. Es eliminiert Pathogene und Tumorzellen Antigen-unspezifisch und folgt einem starren, stereotyp ablaufenden Muster. Zu den löslichen Bestandteilen des angeborenen Immunsystems gehören z. B. die Faktoren des Komplementsystems und Zytokine. Die Hauptaufgabe des Komplementsystems ist die Markierung von Pathogenen, um deren verstärkte Internalisierung durch phagozytierende Zellen zu erreichen. Diese Vorgänge werden unter dem Begriff der Opsonisierung zusammengefasst. Die Enzymkaskade des aktivierten Komplementsystems führt zur Formation eines lytischen Membrankomplexes, so dass Pathogene abgetötet werden. Zytokine, wie Interleukin (IL)-1, IL-6, Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α und Interferon (IFN)- γ , dienen als Botenstoffe und gewährleisten die Kommunikation zwischen den Immunzellen. Zusätzlich beteiligen sich die löslichen Komponenten des natürlichen Immunsystems an der Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen. Zu den zellulären Bestandteilen des angeborenen Immunsystems gehören unter anderem Makrophagen, Granulozyten, Natürliche „Killer“ (NK)-Zellen und dendritische Zellen (DCs). Makrophagen und neutrophile Granulozyten erkennen Bakterien, die sie phagozytieren und durch Produktion reaktiver Sauerstoff-Intermediärprodukte zerstören. NK-Zellen kennzeichnet ihr zytotoxisches Potential, insbesondere bei der Lyse von Virus-infizierten Zellen oder Tumorzellen. Die Hauptaufgabe von DCs ist die Induktion und Expansion von T-Lymphozyten durch Präsentation Pathogen- oder Tumor-spezifischer Peptide.

Die adaptive Abwehr von Pathogenen definiert sich durch die spezifische Erkennung von Antigenen und die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Das erworbene Immunsystem setzt sich aus T- und B-Lymphozyten sowie deren löslichen Produkten, den Antikörpern, zusammen. T-Zellen werden entsprechend ihrer Funktionen und ihrer Oberflächenmoleküle in immunmodulatorische CD4⁺ T-Helfer (Th)-Zellen und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (CTLs) unterteilt. Antigen-spezifische CD8⁺ CTLs töten infizierte Zellen und Tumorzellen durch Apoptoseinduktion ab. CD4⁺ T-Zellen werden entsprechend

ihres Zytokinexpressionsprofils in Th1-, Th2-, Th17- und regulatorische T-Lymphozyten unterteilt, die sich funktionell voneinander unterscheiden. Th1-Zellen produzieren IFN- γ und TNF- α , die unter anderem aktivierend auf Phagozyten und NK-Zellen wirken. Damit sind Th1-Zellen für die Ausbildung einer effektiven zellulären proinflammatorischen Immunreaktion verantwortlich. Eine besondere Rolle unter den proinflammatorischen T-Lymphozyten nehmen die vor kurzem identifizierten Th17-Zellen ein. Sie sekretieren hauptsächlich IL-17 und tragen zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion bei, das ist insbesondere bei Autoimmunerkrankungen von Bedeutung (Stockinger und Veldhoen, 2007). Th2-Zellen kennzeichnet die Synthese von Zytokinen, wie IL-4, IL-5 und IL-6, die durch Aktivierung und Differenzierung von B-Lymphozyten die Induktion einer humoralen Immunantwort vermitteln. Regulatorische T-Lymphozyten inhibieren die Aktivität der anderen T-Zell-Populationen und terminieren somit die induzierte Immunreaktion. Darüber hinaus kontrollieren regulatorische T-Zellen die Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen durch Produktion von IL-10 und „transforming growth factor“ (TGF)- β (Boyman *et al.*, 2007; Reiner, 2007). Antigen-spezifische B-Lymphozyten proliferieren nach ihrer Aktivierung und differenzieren sich zu Plasmazellen aus, die im Gewebe oder im Knochenmark Antikörper produzieren. Als lösliche Moleküle können Antikörper Toxine neutralisieren, das Komplementsystem aktivieren, Pathogene opsonisieren und die zelluläre Zytotoxizität verstärken. Nach Ausbildung einer adaptiven Immunantwort kann sich ein immunologisches Gedächtnis entwickeln. Dabei induzieren T- und B-Gedächtniszellen bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen Pathogen eine schnellere, stärkere und länger anhaltende Immunreaktion.

1.2 Dendritische Zellen

1.2.1 Aufgaben und Funktionen dendritischer Zellen

DCs gehören zum angeborenen Immunsystem und nehmen eine zentrale Stellung in der Regulation der Immunabwehr ein. Sie zeichnen sich durch die ausgeprägte Fähigkeit zur Aufnahme, Prozessierung sowie Präsentation von Antigenen aus und sind somit für die Induktion einer spezifischen T-Zell-Antwort essentiell (Banchereau *et al.*, 2000; Steinman, 2007).

DCs durchlaufen verschiedene Stadien der Reifung. Diese grenzen sich durch charakteristische Expressionsmuster von Oberflächenmolekülen und durch funktionelle Eigenschaften voneinander ab. DCs entwickeln sich aus Stammzellen im Knochenmark

und gelangen über den Blutweg in nichtlymphatische Organe, in denen eine Konfrontation mit Antigenen erfolgt. Diese DCs befinden sich in einem unreifen Entwicklungszustand, in dem die Fähigkeit zur Induktion einer Antigen-spezifischen T-Zell-Antwort gering ist. Die Ursache dafür liegt in der geringen Expression von kostimulatorischen Molekülen und Pathogen-spezifischen Peptiden in Komplexen mit „major histocompatibility complex“ (MHC)-Molekülen durch immature DCs. Zur gleichen Zeit besitzen DCs eine hohe Kapazität zur Aufnahme von Antigenen. In diesem Zusammenhang werden Moleküle auf Virus-infizierten Zellen, Tumorzellen und Bakterien von zirkulierenden Antikörpern, Pentraxinen und Kollektinen gebunden. Als Oponisine assoziieren sie mit Fc-, Pentraxin- sowie Kollektin-Rezeptoren auf der Oberfläche von DCs und bewirken die Endozytose der gebundenen Strukturen. Außerdem ermöglichen Phagozytose und Makropinozytose die Internalisierung von Antigenen, die sich von Mikroorganismen sowie apoptotischen oder nekrotischen Zellfragmenten ableiten (Sabatté *et al.*, 2007; Ueno *et al.*, 2007). Die entstandenen Vesikel verschmelzen mit Lysosomen und bilden Phagolysosomen, in denen der proteolytische Abbau der aufgenommenen Proteine erfolgt. Bei entsprechender Länge und Sequenz assoziieren die entstandenen Peptide mit den Bindungsgruben von MHC-Klasse II-Molekülen. MHC-Klasse II-Moleküle werden zuvor im Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert, eine Beladung der Bindungsgrube im ER wird vom „class II-associated invariant chain peptide“ (CLIP), einem Bestandteil der so genannten invarianten Kette (Ii), verhindert. Die Ii stabilisiert das MHC-Klasse II-Molekül und steuert seinen Transport ins Phagolysosom. Hier wird die Ii proteolytisch gespalten und die Bindungsgrube frei, so dass sich ein prozessiertes Peptid anlagern kann. Die MHC-Klasse II-Peptid-Komplexe werden auf die Zelloberfläche transportiert, um mit den T-Zell-Rezeptoren (TCRs) der CD4⁺ T-Lymphozyten zu interagieren (Guermontprez und Amigorena, 2005; Wilson und Villadangos, 2005; Sato und Fujita, 2007). Im Gegensatz dazu erfolgt die Aktivierung von CD8⁺ CTLs durch MHC-Klasse I-Peptid-Komplexe. Diese Peptide leiten sich meist von intrazytoplasmatischen Proteinen ab, die nach Ubiquitinylierung im Proteasom gespalten werden. Mit Hilfe von Transportmolekülen, den „transporters associated with antigen processing“ (TAPs), gelangen die Peptide aus dem Zytosol ins ER. TAPs binden bevorzugt Peptide, die aufgrund ihrer Länge und Aminosäuresequenz Affinitäten für die Bindungsgruben der MHC-Klasse I-Moleküle aufweisen. Bindet ein Peptid an die Bindungsgrube eines affinen MHC-Klasse I-Moleküls, wird der Komplex über den Golgi-Apparat auf die Zelloberfläche transportiert (Sabatté *et al.*, 2007; Sato und Fujita, 2007; Villadangos und Schnorrer, 2007).

Peptide, die sich von extrazellulären Proteinen ableiten, können ebenfalls auf MHC-Klasse I-Molekülen präsentiert werden und CD8⁺ CTLs aktivieren. Dementsprechend werden endogene Proteine mittels MHC-Klasse II-Molekülen

präsentiert und führen zur Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen. Diese Mechanismen, zu denen insbesondere DCs in der Lage sind, werden unter dem Begriff der Kreuzpräsentation zusammengefasst (Brode und Macary, 2004; Guermonprez und Amigorena, 2005).

Die Voraussetzung für eine effektive Aktivierung von T-Lymphozyten ist die Ausreifung von DCs. Pathogen-assoziierte Gefahrensignale initiieren die Maturation von DCs und werden mit Hilfe von spezifischen Rezeptoren, z. B. den „Toll-like receptors“ (TLRs), identifiziert. TLRs werden sowohl auf der Zellmembran als auch intrazellulär exprimiert, um konservierte mikrobielle Moleküle, wie Lipopolysaccharide (LPS), Lipoteichonsäure, doppelsträngige virale RNA oder nicht methylierte, bakterielle DNA (CpG-DNA), zu erkennen. Darüber hinaus führen Zytokine, wie IL-1, „granulocyte-macrophage colony-stimulating factor“ (GM-CSF) und TNF- α , zur Ausreifung von DCs (Banchereau, 2000; Zou und Tam, 2002; Macagno *et al.*, 2007). Die phänotypischen Veränderungen von reifenden DCs umfassen vor allem die verstärkte Expression von MHC-Klasse I- sowie MHC-Klasse II-Molekülen, von Adhäsionsmolekülen und kostimulatorischen Molekülen. Gleichzeitig wird die Expression von endozytotischen und phagozytotischen Rezeptoren reduziert und damit die Aufnahme von Antigenen stark eingeschränkt. Außerdem erfolgt die Expression von Chemokin-Rezeptoren, wie CCR7, welche die Migration von DCs aus dem Gewebe in die sekundären lymphatischen Organe vermitteln (Randolph *et al.*, 2005; Angeli *et al.*, 2006; Macagno *et al.*, 2007). Mature DCs charakterisiert die Sekretion von Zytokinen, wie TNF- α , IL-12 und Typ I-Interferonen, die sowohl im Gewebe als auch im Lymphknoten immunmodulatorisch wirksam sind (Banchereau *et al.*, 2000; Pulendran, 2005; Villadangos und Schnorrer, 2007).

Die Aktivierung der T-Zellen im Parakortex der Lymphknoten erfolgt entsprechend der „Zwei-Signal-Hypothese“, einer heute weitgehend akzeptierten Modellvorstellung. Der Kontakt zwischen DCs und naiven T-Lymphozyten wird dabei von Adhäsionsmolekülen, wie „intracellular adhesion molecule“ (ICAM)-1 und „lymphocyte function-associated antigen“ (LFA)-3 ermöglicht. Das erste Signal wird durch die Interaktion zwischen dem MHC-Peptid-Komplex auf DCs und einem affinen TCR auf T-Zellen generiert. Das zweite Signal liefern kostimulatorische Moleküle der B7-Familie auf DCs, wie CD80 oder CD86, die an ihren Rezeptor CD28 auf T-Zellen binden. Nur wenn naive T-Zellen beide Signale durch reife DCs erhalten, proliferieren sie und differenzieren sich zu Effektorzellen (Acuto und Michel, 2003; Mempel *et al.*, 2004; Dustin *et al.*, 2006). Erkennt ein naiver T-Lymphozyt jedoch MHC-Peptid-Komplexe, die von immaturren DCs präsentiert werden, fehlt das zweite Aktivierungssignal durch die kostimulatorischen Moleküle und eine Anergisierung der T-Zelle erfolgt (Höpken *et al.*, 2005). Darüber hinaus sind unreife DCs zur Produktion von IL-10 in der Lage, das Effektor-T-Zellen hemmt und an der Differenzierung immunsuppressiver regulatorischer T-Lymphozyten beteiligt ist. Mit Hilfe

dieser Strategien wird eine Aktivierung des Immunsystems gegen körpereigene Strukturen verhindert. Sie werden unter dem Begriff der peripheren Toleranz zusammengefasst (Banchereau *et al.*, 2000; Rutella *et al.*, 2006; Zou, 2006; Belkaid, 2007).

1.2.2 Subpopulationen humaner dendritischer Zellen im Blut

In ersten Untersuchungen wurden DCs als Zellen definiert, die MHC-Klasse II-Moleküle in hoher Dichte auf ihrer Oberfläche exprimieren, denen jedoch Markermoleküle anderer Zellpopulationen, wie CD3, CD14, CD19 und CD56 fehlen. Der Mangel an spezifischen Molekülen erschwerte die Isolation nativer DCs aus dem Blut, deshalb wurden Verfahren entwickelt, mit denen DCs aus CD14⁺ Monozyten oder CD34⁺ Stammzellen generiert werden. Vor allem Monozyten bieten den Vorteil, dass sie 10 % der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) umfassen und deshalb in großen Mengen isoliert werden können. Die Kultur mit Zytokinen, wie GM-CSF und IL-4, bewirkt die Entwicklung immaturer DCs. Die Stimulation der aus Monozyten generierten DCs (MoDCs) durch Zytokine, wie TNF- α , IL-6 oder IL-1 β und Pathogenstrukturen, wie LPS, CpG-DNA oder synthetische doppelsträngige Nukleinsäuresequenzen (polyI:C), gewährleistet ihre Reifung (Sato und Fujita, 2007; Wu and Liu, 2007). In den letzten Jahren gelang die Identifizierung und Charakterisierung von verschiedenen humanen DC-Subpopulationen im Blut, die aufgrund der Expression charakteristischer Oberflächenmoleküle in myeloide und plasmazytoide DCs unterteilt werden (MacDonald *et al.*, 2002; Colonna *et al.*, 2006; Takeuchi und Furue, 2007).

Plasmazytoide DCs (pDCs) zeichnen sich durch eine hohe Expression von CD123 und das Fehlen von CD11c aus. Weitere myeloide Marker, wie CD11b, CD13 und CD33, sind ebenfalls nicht vorhanden. Dagegen exprimieren pDCs charakteristische Moleküle, wie BDCA-2, BDCA-4, prä-T α und Spi-B (Shortman und Liu, 2002; Schotte *et al.*, 2003; Soumelis und Liu, 2006). Die Namensgebung der pDCs beruht auf ihrer Morphologie, die an Plasmazellen mit einem hohen Gehalt an rauem ER erinnert. Eine Infektion mit Bakterien oder Viren aktiviert unreife pDCs durch Stimulation von TLR-7, -8 und -9 (Banchereau *et al.*, 2000; Barchet *et al.*, 2005; Fuchsberger *et al.*, 2005). Die muren pDCs sind in der Lage, große Mengen von Typ I-Interferonen zu produzieren, die das Wachstum infizierter Zellen hemmen und Immunzellen, wie Makrophagen oder NK-Zellen, aktivieren. In Abhängigkeit von den mikrobiellen Stimulatoren im infizierten Gewebe können pDCs in den Lymphknoten die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Lymphozyten in Th1- oder Th2-Zellen induzieren. Darüber hinaus sind pDCs in der Lage, regulatorische

T-Lymphozyten zu aktivieren, die an der Beendigung einer Immunantwort beteiligt sind sowie eine Überreaktion des Immunsystems verhindern (Fuchsberger *et al.*, 2005; Zhang und Wang, 2005; Takeuchi und Furue, 2007).

Die heterogene Population der myeloiden DCs (mDCs) wird durch die Expression von CD11b, CD11c, CD13 und CD33 sowie eine geringe Dichte an CD123 definiert. MDCs erkennen Mikroben mit Hilfe von TLR-1, -2, -4, -5 und -8 sowie mittels Mannose-Rezeptoren (Liu, 2001; Sallusto und Lanzavecchia, 2002; Shortman und Liu, 2002; Van Vliet *et al.*, 2007). Die Pathogen-abhängige Stimulation von mDCs im Gewebe bestimmt ihre Wirkung in den Lymphknoten. Eine Aktivierung durch LPS kann, z. B. TLR-4-vermittelt, zur Sekretion von IL-12 führen, das die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen in Th1-Zellen fördert (Rissoan *et al.*, 1999; de Jong *et al.*, 2005; Schäkel *et al.*, 2006). Der Kontakt mit „thymic stromal lymphopoietin“ (TSLP), das von Epithelzellen bei viralen Infektionen freigesetzt wird, induziert die Präsentation des Ox40-Liganden, so dass diese mDCs die Entwicklung von Th2-Lymphozyten unterstützen (Watanabe *et al.*, 2005; Steinman und Hemmi, 2006; Kadowaki, 2007). In neusten Untersuchungen werden mDCs in drei Untergruppen gegliedert. Durch die Expression charakteristischer Oberflächenmoleküle werden sie als CD16⁺, CD1c⁺ und BDCA3⁺ mDCs beschrieben (Lindstedt *et al.*, 2005). Der Anteil der BDCA3⁺ mDCs im Blut ist allerdings sehr gering, so dass über ihre Funktion in der Immunantwort nur wenig bekannt ist. CD16⁺ mDCs sind effiziente Produzenten von immunstimulierenden Zytokinen, wie TNF- α und IL-6. Insbesondere TNF- α ist durch seine systemischen und pleiotropen Wirkungen bei der Induktion einer inflammatorischen Immunreaktion charakterisiert. Dagegen sekretieren CD1c⁺ mDCs große Mengen an IL-8. IL-8 wirkt chemotaktisch auf T-Lymphozyten und induziert deren Migration ins Gewebe. Innerhalb der mDCs erfolgt somit eine Teilung der Aufgaben im Rahmen der Immunantwort. Während CD1c⁺ mDCs durch Freisetzung von Chemokinen Immunzellen in das erkrankte Gewebe locken, aktivieren CD16⁺ mDCs die eingewanderten Lymphozyten durch Sekretion von Zytokinen und induzieren eine Entzündungsreaktion (Piccioli *et al.*, 2007).

Die größte DC-Subpopulation des Blutes gehört zur Gruppe der CD16⁺ mDCs. Sie umfasst 0,6-2 % der mononukleären Zellen des peripheren Blutes und unterscheidet sich von anderen DC-Subpopulationen durch die selektive Expression einer 6-sulfo LacNAc (slan)-Struktur auf dem P-Selektin-Glykoprotein-Liganden-1 (PSGL-1). Weitere phänotypische Charakteristika der slanDCs umfassen die Expression der Rezeptoren für die Anaphylatoxine C5a und C3a (Schäkel *et al.*, 1998; Schäkel *et al.*, 2002). Darüber hinaus wurden slanDCs als wesentliche Produzenten von TNF- α und IL-12 beschrieben (Schäkel *et al.*, 2002; Schäkel *et al.*, 2006). Funktionelle Studien ergaben, dass slanDCs sowohl zu einer Antikörper-abhängigen als auch zu einer Antikörper-unabhängigen Lyse

von Tumorzellen in der Lage sind (Schmitz *et al.*, 2002; Schmitz *et al.*, 2005). slanDCs stimulieren effektiv CD4⁺ T-Lymphozyten gegen Neo- und Recall-Antigene und sind nach Stimulation mit LPS in der Lage, naive CD4⁺ T-Lymphozyten in Th1-Zellen zu differenzieren (Wehner *et al.*, 2006; Straube *et al.*, 2007). Außerdem aktivieren slanDCs CD8⁺ CTLs und unterstützen deren Zytotoxizität gegen Tumorzellen (Schäkel *et al.*, 1998).

1.2.3 Tumortheraeutische Strategien auf der Basis dendritischer Zellen

Obwohl Fortschritte in der lokalen und systemischen Tumortheraeutie die Prognose von Patienten verbesserten, stellen Mikrometastasen weiterhin ein großes Problem bei der Entstehung von Rezidiven dar. Mikrometastasen befinden sich oft nicht im Zellzyklus und können deshalb durch eine Chemotherapie nur unvollständig beseitigt werden. Die Induktion oder Verstärkung der körpereigenen Abwehr erscheint für eine Elimination von Mikrometastasen als eine besonders viel versprechende Strategie. Aus diesem Grund wurden verschiedene immuntherapeutische Methoden entwickelt, zu denen auch eine Aktivierung des Immunsystems durch DCs zählt (Abb. 1) (Schuler *et al.*, 2003; Gilboa, 2007; Tuyaeerts *et al.*, 2007). Ein wesentlicher Vorteil der Verwendung von DCs für die Tumortheraeutie liegt in einer gezielten Manipulation der DCs, so dass eine hohe Expressionsdichte ausgewählter „tumor-associated antigens“ (TAAs) induziert werden kann. Außerdem ist die Kombination mit anderen Behandlungsmethoden, wie Chemo- oder Radiotherapie, möglich (Witheside und Odoux, 2004; Steinman und Banchereau, 2007; Tacke *et al.*, 2007). Im Rahmen verschiedener Tumortheraeutien werden DCs genutzt, deren Beladung mit synthetischen Peptiden *in vitro* erfolgt. Der Aufbau dieser Peptide leitet sich von der bekannten Aminosäuresequenz eines Tumorantigens ab. Außerdem können DCs durch eine Behandlung mit Tumorlysaten oder rekombinant hergestellten Tumorproteinen modifiziert werden. DCs nehmen diese Tumorbestandteile auf, prozessieren sie und präsentieren sie auf MHC-Klasse II- und nach Kreuzpräsentation auf MHC-Klasse I-Molekülen (Barfoed *et al.*, 2000; Slingluff *et al.*, 2003; Rosenberg *et al.*, 2004). Des Weiteren besteht die Möglichkeit, DCs mit Hilfe von TAA-kodierenden viralen Vektoren zu transduzieren. Die Antigene werden bei dieser Methode stabil exprimiert und länger präsentiert. Andere Strategien beruhen auf der Beladung von DCs mit Tumor-RNA oder der Transfektion mit mRNA, die für ein spezielles Tumorantigen kodieren (Nestle *et al.*, 1998; Figdor *et al.*, 2004). Durch Präsentation von TAAs in Form von MHC-Peptid-Komplexen und die gleichzeitige Expression kostimulatorischer Moleküle sind die *ex vivo*-behandelten DCs zur Aktivierung von Tumorspezifischen CD4⁺ T-Lymphozyten und Tumor-reaktiven CD8⁺ CTLs in der Lage. Studien

an Mausmodellen demonstrierten, dass eine Applikation *in vitro*-beladener DCs sowohl das Anwachsen von Tumoren verhindert als auch zu einer Regression etablierter Tumoren führt (Zitvogel *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1997; Banchereau und Palucka, 2005). Darüber hinaus wurde in verschiedenen klinischen Studien mit Tumorpatienten, bei denen eine Behandlung mit Tumorantigen-beladenen DCs erfolgte, sowohl eine Tumorregression als auch die Induktion von Antigen-spezifischen T-Zellen beobachtet (Turner *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2003; Wierdecky *et al.*, 2006).

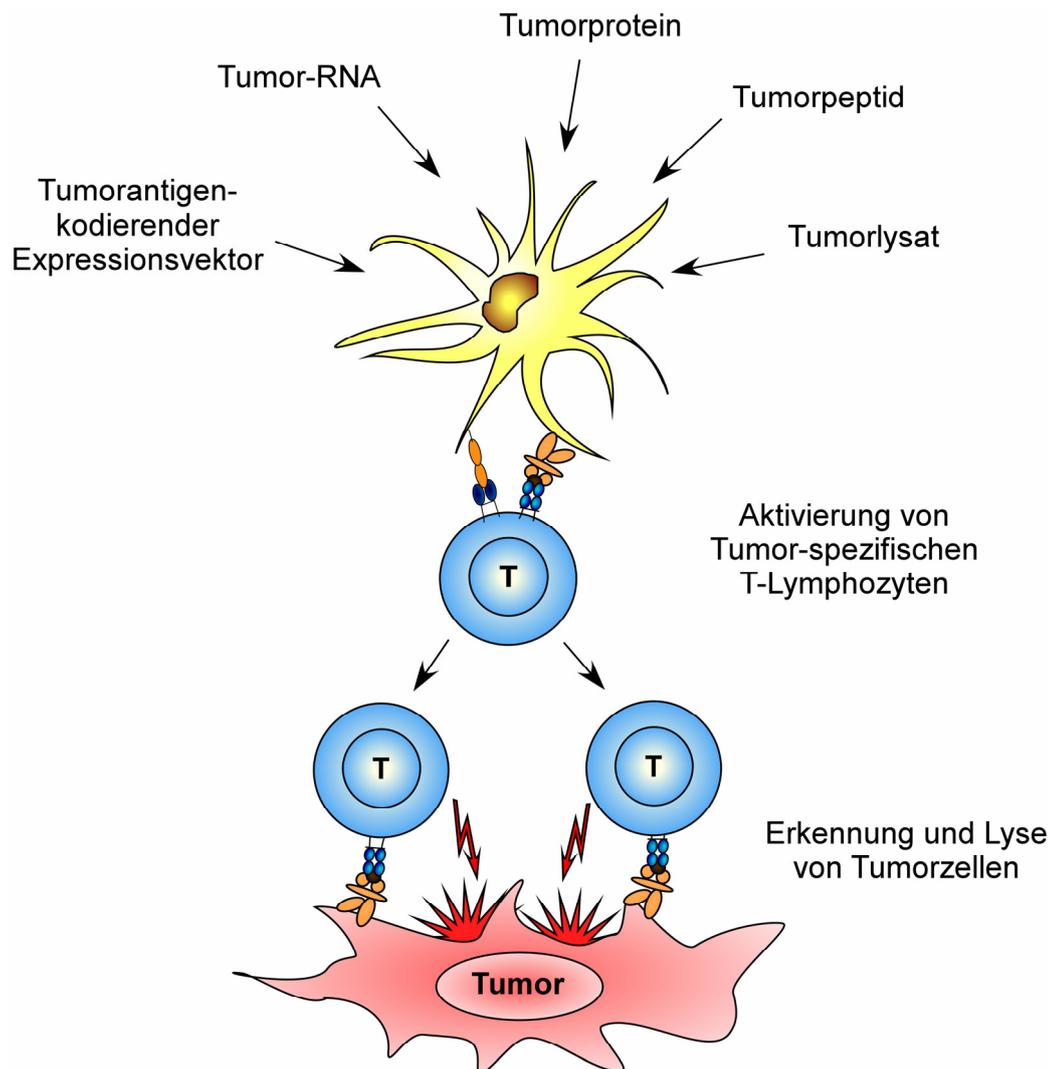


Abbildung 1: Schematische Darstellung unterschiedlicher Strategien zur Aktivierung von DCs, um eine effiziente T-Zell-vermittelte antitumorale Immunreaktion zu induzieren. Die Modifikation von DCs kann durch eine exogene Beladung mit synthetischen Peptiden, rekombinant hergestellten Tumor-assoziierten Proteinen, Tumorlysaten, Tumor-abgeleiteter RNA oder Tumorantigen-kodierenden Expressionsvektoren erfolgen. Die modifizierten DCs sind aufgrund ihrer starken Oberflächenexpression von MHC-assoziierten Tumorpeptiden sowie von kostimulatorischen Molekülen sehr effizient in der Lage, Tumor-reaktive T-Lymphozyten zu aktivieren.

1.3 Natürliche „Killer“-Zellen

1.3.1 Aufgaben und Funktionen von NK-Zellen

NK-Zellen gehören zu den zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems und nehmen eine Schlüsselposition bei der Elimination von Viren und Tumorzellen ein. NK-Zellen entwickeln sich aus Stammzellen des Knochenmarks und umfassen etwa 5-10 % der Lymphozyten des Blutes. Sie sind aber auch in den peripheren Geweben und den Lymphknoten zu finden. Ihre Abgrenzung von anderen Zellpopulationen des Blutes ermöglicht die charakteristische Expression von CD56, einer Isoform des neuronalen Zell-Adhäsionsmoleküls. Außerdem fehlen auf NK-Zellen Antigen-spezifische Erkennungsstrukturen, wie der TCR (O'Connor *et. al.*, 2005; Arnon *et. al.*, 2006; Di Santo, 2006). Die Antigen-unspezifische Abwehr von Pathogenen durch NK-Zellen erfolgt sowohl durch ihre zytotoxische Aktivität als auch durch die Sekretion von Zytokinen. Konservierte Oberflächenmoleküle infizierter Zellen oder proinflammatorische Zytokine, wie Typ I-Interferone, IL-2, IL-15 und IL-18, induzieren die Stimulation von NK-Zellen (Bryceson *et. al.*, 2006 A; Marcenaro *et al.*, 2006; Zanoni *et al.*, 2007).

Nach heutigem Kenntnisstand existieren zwei Subpopulationen von NK-Zellen, die sich phänotypisch und funktionell unterscheiden. 90 % der NK-Zellen des Blutes sind durch eine relativ geringe Expression von CD56 und eine hohe Expressionsdichte von CD16 charakterisiert. Die Hauptaufgabe der CD56⁺ CD16⁺⁺ NK-Zellen besteht in der Lyse von Virus-infizierten Zellen oder Tumorzellen durch die Expression von Fas-Ligand, „TNF-related apoptosis-inducing ligand“ (TRAIL) und TNF- α sowie die Sekretion von Granzym-Perforin-Granula. Diese zytotoxischen Moleküle sind in der Lage, Apoptose in den Zielzellen zu induzieren (Smyth *et al.*, 2005; Farag und Caligiuri, 2006; Romagnani *et al.*, 2007). Die zweite NK-Zell-Subpopulation zeichnet sich phänotypisch durch eine hohe Expression von CD56 und das Fehlen von CD16 aus. Sie kommt hauptsächlich in den Lymphknoten vor und umfasst lediglich 5-10 % der NK-Zellen des Blutes. CD56⁺⁺ CD16⁻ NK-Zellen kennzeichnet eine ausgeprägte Produktion von Zytokinen, wie IFN- γ , TNF- α und GM-CSF, mit denen sie die Immunabwehr regulieren (Ferlazzo und Münz, 2004; Farag und Caligiuri, 2006). So ist IFN- γ von herausragender Bedeutung während viraler Infektionen, denn es hemmt die Proliferation und die Proteinbiosynthese der infizierten Körperzellen, um eine Vervielfältigung der Viren zu verhindern. Des Weiteren aktiviert IFN- γ phagozytierende Zellen, wie Makrophagen, die nun verstärkt apoptotische Körperchen von infizierten Zellen aufnehmen und eliminieren. In den Lymphknoten

können NK-Zellen durch Produktion von IFN- γ die Differenzierung von naiven T-Lymphozyten in Th1-Zellen unterstützen (Young und Bream, 2007). Damit tragen NK-Zellen entscheidend zur Induktion einer proinflammatorischen Immunantwort bei (Morandi *et al.*, 2006; Moretta *et al.*, 2006; Zanoni *et al.*, 2007).

1.3.2 Aktivierende und inhibierende NK-Zell-Rezeptoren

Die Ereignisse der NK-Zell-vermittelten Erkennung und Lyse von potentiellen Zielzellen sind komplex und noch nicht in allen Einzelheiten geklärt. Eine Beteiligung von inhibierenden und aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren wurde in den letzten Jahren demonstriert. Die verantwortlichen Moleküle werden entsprechend ihrer Struktur in Immunglobulin-ähnliche und in C-Typ-Lektin-ähnliche Rezeptoren unterteilt (Moretta *et al.*, 2005 B; Bottino *et al.*, 2006).

Zu den Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie zählen „killer cell immunoglobulin-like receptors“ (KIRs). Ihr extrazellulärer Teil setzt sich aus zwei oder drei Immunglobulin-ähnlichen Domänen zusammen. Inhibierende KIRs (KIR2DL/KIR3DL) besitzen eine lange intrazytoplasmatische Domäne, die eine „immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif“ (ITIM)-Struktur aufweist. Dagegen haben aktivierende KIRs eine kurze intrazytoplasmatische Sequenz (KIR2DS/KIR3DS), die mit „immunoreceptor tyrosine-based activation motif“ (ITAM)-tragenden Adaptermolekülen assoziiert. Die KIRs der NK-Zellen interagieren mit MHC-Molekülen auf den Oberflächen der Zellen und beeinflussen durch aktivierende sowie inhibierende Signale den Aktivierungszustand von NK-Zellen (Moretta *et al.*, 2005 B; Sentman *et al.*, 2006).

„Natural cytotoxicity receptors“ (NCRs) gehören ebenfalls zu den aktivierenden Immunglobulin-ähnlichen Molekülen. Wichtige Vertreter sind NKp30, NKp44 und NKp46, die auf der Oberfläche von NK-Zellen exprimiert werden (Raulet, 2004). Es wurde festgestellt, dass NKp44 und NKp46 Hämagglutinin und Neuraminidase auf den Oberflächen von Zellen erkennen, die mit Influenza- oder Parainfluenza-Viren infiziert sind (Arnon *et al.*, 2006; Sentman *et al.*, 2006). Nach Ligandenbindung des NKp46 erfolgt die Aktivierung der NK-Zellen durch Assoziation mit der ITAM-tragenden CD3 ζ -Kette. Dagegen wirkt NKp44 mittels „killer cell activating receptor-associated protein“ (KARAP) oder „DNAX-activating protein“ (DAP)-12 stimulierend. Als Ligand für NKp30 wurde bisher nur das Tegumentprotein pp65 des humanen Zytomegalievirus identifiziert (Arnon *et al.*, 2006). Es wirkt jedoch inhibierend auf NK-Zellen, da es zur Dephosphorylierung der CD3 ζ -Kette führt. Die Liganden der NCRs auf Tumorzellen sind allerdings noch unbekannt (Bryceson *et al.*, 2006 A; Farag und Caligiuri, 2006).

Zu den C-Typ-Lektin-Rezeptoren gehören die Mitglieder der NKG2-Familie. Die erste Gruppe bildet Heterodimere mit CD94 und umfasst inhibierende (NKG2A/B) sowie aktivierende (NKG2C/E) Rezeptoren (Shilling *et al.*, 2002; Wada *et al.*, 2004; O'Connor *et al.*, 2005). NKG2D gehört zum zweiten Teil der NKG2-Familie und weist keine Homologien zu NKG2A-E auf. Es bildet Homodimere, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Farag *et al.*, 2002; Bryceson *et al.*, 2006 A). Zur Weiterleitung von Signalen assoziiert NKG2D mit dem Adaptermolekül DAP10, das ITAM-unabhängig zur Aktivierung von NK-Zellen führt. Die Liganden von NKG2D, „MHC class I chain-related antigens“ (MIC)A, MICB und „unique long 16-binding proteins“ (ULBPs)1-4, werden von infizierten und gestressten Zellen exprimiert, um eine Lyse durch zytotoxische Effektorzellen zu induzieren (Farag und Caligiuri, 2006; Moretta *et al.*, 2006; Zwirner *et al.*, 2007).

Zusätzlich exprimieren NK-Zellen stimulierende Korezeptoren, wie LFA-1, 2B4 und „DNAX accessory molecule“ (DNAM)-1. Das Adhäsionsmolekül LFA-1 erkennt ICAM-1 und gewährleistet den Kontakt zwischen den Zellen. Identifiziert die NK-Zelle eine gestresste Zelle, ändert LFA-1 seine Konformation. Diese neue Struktur stabilisiert die interzelluläre Bindung und unterstützt die Aktivierung der NK-Zelle. 2B4 verstärkt, nach Assoziation mit CD48, die Adhäsion zwischen NK-Zellen und Zielzellen. Außerdem interagiert 2B4 mit Adaptermolekülen, die ITAM-unabhängig aktivierend wirken (Bryceson *et al.*, 2006 B). DNAM-1 verstärkt durch Bindung an seine Liganden, den Polio-Virus-Rezeptor (PVR) und Nectin 2, die Zytotoxizität von NK-Zellen (Pende *et al.*, 2005). Darüber hinaus erhöhen Korezeptoren die Signale aktivierender Rezeptoren. Es wurde z. B. demonstriert, dass 2B4 und DNAM-1 durch Wechselwirkungen mit NKG2D eine Verstärkung der aktivierenden Signale für NK-Zellen bewirken (Bottino *et al.*, 2005; Moretta *et al.*, 2005 B).

Trotz der Identifizierung der oben beschriebenen Rezeptoren sind die genauen Mechanismen zur Aktivierung von NK-Zellen noch nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass die Integration verschiedener aktivierender und inhibierender Einzelsignale den Funktionszustand der NK-Zellen bestimmt. Befinden sich die Signale der aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren im Gleichgewicht oder überwiegen hemmende, erfolgt die Aufrechterhaltung des Ruhezustandes der NK-Zellen. Interagiert eine NK-Zelle beispielsweise mit einer gesunden Körperzelle, können sowohl inhibitorische als auch aktivierende Rezeptoren an ihre Liganden auf der normalen Körperzelle binden. In dieser Konstellation überwiegen meist inhibitorische Signale und die gesunde Zelle wird nicht lysiert (Moretta *et al.*, 2005; Zanoni *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu werden NK-Zellen aktiviert, wenn verstärkt aktivierende Rezeptoren an ihre Liganden binden oder Liganden für inhibierende Rezeptoren fehlen. Dabei regulieren

Tumorzellen oder Virus-infizierte Zellen MHC-Klasse I-Moleküle herunter, so dass die Liganden für inhibitorische Rezeptoren, wie KIRs und CD94/NKG2A wegfallen. Entsprechend der „missing self“-Hypothese führt diese Reduktion der inhibitorischen Signale zur Aktivierung der NK-Zellen und zur Lyse der MHC-Klasse I-negativen Zellen (Farag *et al.*, 2002; Raulet, 2004; Moretta *et al.*, 2005 B; Ruggeri *et al.*, 2007 B). Gleichzeitig können infizierte Zellen oder Tumorzellen Liganden für aktivierende NK-Zell-Rezeptoren neu oder verstärkt präsentieren. Die Rezeptor-Ligand-Interaktionen mit diesen Zielzellen führen zu einer Verstärkung der aktivierenden Signale und entsprechend der „non-self recognition“- sowie der „stress-induced recognition“-Hypothese erfolgt eine Stimulation der NK-Zell-Zytotoxizität (Smyth *et al.*, 2005; Gasser und Raulet, 2006; Zamai *et al.*, 2007). Strategien zur Manipulation der Expression aktivierender und inhibierender NK-Zell-Rezeptoren und ihrer Liganden eröffnen somit neue Möglichkeiten in der Therapie von Infektions- und Tumorerkrankungen (Moretta *et al.*, 2005 B; Zamai *et al.*, 2007).

Neben dem direkten Kontakt zwischen NK-Zelle und Zielzelle können auch Antikörper eine Zytolyse von infizierten Zellen oder Tumorzellen bewirken. Dieser Mechanismus wird als „antibody-dependent cellular cytotoxicity“ (ADCC) bezeichnet. NK-Zellen, die den Fc γ -Rezeptor III (CD16) exprimieren, erkennen die konstante Region von Immunglobulin (Ig) G-Antikörpern, die mit ihrer variablen Region an Antigenstrukturen auf Zielzellen gebunden haben. Die Vernetzung der Fc γ -Rezeptoren führt zur Aktivierung des zytotoxischen Potentials von NK-Zellen (Leibson *et al.*, 1997; Sulica *et al.*, 2001; Bryceson *et al.*, 2006 A).

1.3.3 NK-Zellen als Effektorzellen gegen Tumoren

Zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen haben NK-Zellen als zytotoxische Effektorzellen bei der Elimination von Tumoren charakterisiert (Smyth *et al.*, 2005; Farag und Caligiuri, 2006). Deshalb werden NK-Zellen in die Entwicklung antitumoraler Immuntherapien integriert (Abb. 2). Die subkutane Injektion von IL-2 reduzierte beispielsweise die Tumorlast in Patienten. Dabei aktiviert IL-2 NK-Zellen und stimuliert ihr Wachstum (Solana *et al.*, 2007; Woan und Reddy, 2007). In neusten Untersuchungen wird IL-15 verwendet, das die Proliferation von NK-Zellen und ihre Aktivierung induziert (Boyiadzis und Foon, 2006; Zamai *et al.*, 2007). Die Applikation von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, wie „FMS-related tyrosine kinase“ (Flt)3, IL-7 oder den Stammzellfaktor (SCF), soll die Langlebigkeit und die Expansion von NK-Zellen fördern (Ljunggren und Malmberg, 2007; Zamai *et al.*, 2007). Die Behandlung von Patienten mit

TAA-spezifischen Antikörpern, wie Trastuzumab bei Mamakarzinom oder Rituximab bei B-Zell-Lymphomen, kann zur Aktivierung von NK-Zellen führen. In diesem Fall vermittelt CD16 die Stimulation von NK-Zellen und induziert eine ADCC gegenüber Tumorzellen (Iannello und Ahmad, 2005; Zhang *et al.*, 2007). Im Rahmen der Therapie von Leukämiepatienten durch Stammzelltransplantationen zeigte sich, dass NK-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Elimination von Tumorzellen spielen. Dabei sind NK-Zellen auch an der Reduktion der Wahrscheinlichkeit einer Transplantatabstoßung sowie am Schutz des Empfängers vor einer Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion, der „graft-versus-host-disease“, beteiligt (Ruggeri *et al.*, 2002). Es wird angenommen, dass alloreaktive NK-Zellen des Spenders mit Hilfe ihrer KIRs die Unterschiede in der Expression von MHC-Klasse I-Molekülen auf der Oberfläche der Leukämiezellen des Empfängers erkennen. Dieser Vorgang beruht auf dem so genannten KIR-Liganden-„mismatch“. Die fehlenden inhibierenden Signale fördern die Aktivierung der Spender-NK-Zellen und ihr zytotoxisches Potential gegenüber den Leukämiezellen (Farag *et al.*, 2002; Beelen *et al.*, 2005; Aversa *et al.*, 2005; Ruggeri *et al.*, 2007 A). Des Weiteren werden zurzeit Therapien entwickelt, in denen NK-Zellen durch adoptiven Transfer in Tumorpatienten die Behandlung von Leukämien, metastasierenden Melanomen und Nierenzellkarzinomen unterstützen sollen (Miller *et al.*, 2005; Ruggeri *et al.*, 2005; Woan und Reddy, 2007).

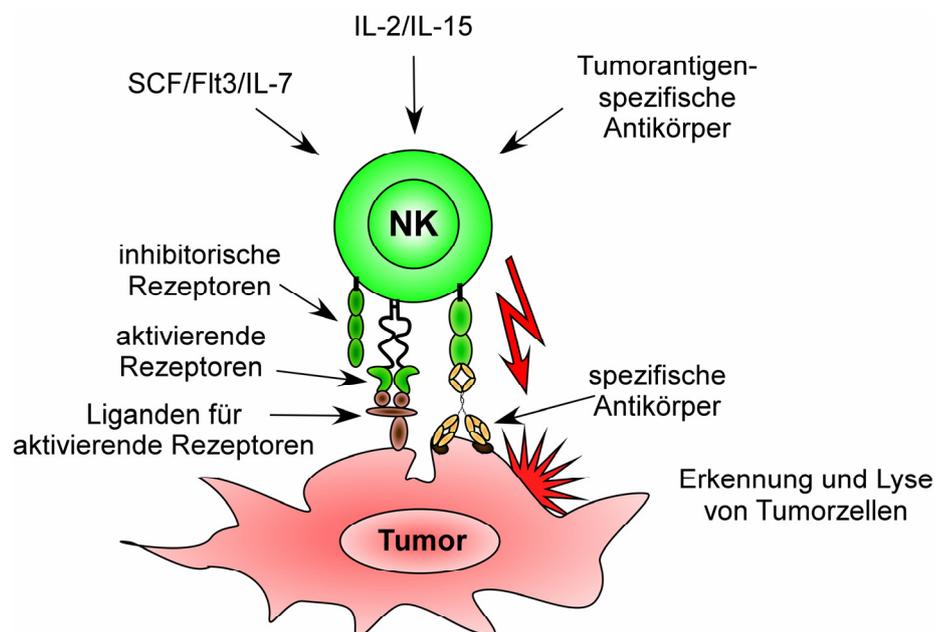


Abbildung 2: Schematische Darstellung verschiedener Strategien zur Stimulation Tumor-reaktiver NK-Zellen.

Die Applikation von Zytokinen, wie IL-2, und Wachstumsfaktoren, wie Flt3, stimuliert die Proliferation, das Überleben und das zytolytische Potential von NK-Zellen. Dabei erkennen NK-Zellen Tumorzellen, die Liganden für inhibitorische Rezeptoren herunter- und für aktivierende Rezeptoren aufreguliert haben. Darüber hinaus aktivieren Tumorantigen-spezifische Antikörper gezielt die Zytotoxizität von NK-Zellen durch Assoziation mit dem Fc γ III-Rezeptor (CD16).

1.4 Interaktionen von NK-Zellen und dendritischen Zellen

In den letzten Jahren ergaben sich vermehrt Hinweise, dass DCs nicht nur mit Zellen des adaptiven, sondern auch mit Effektorzellen des angeborenen Immunsystems, insbesondere mit NK-Zellen, interagieren (Walzer *et al.*, 2005 A; Moretta *et al.*, 2005 A; Zitvogel *et al.*, 2006). Am Mausmodell wurde die DC-vermittelte Aktivierung von NK-Zellen beschrieben, die zu einer verstärkten Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen führt (Fernandez *et al.*, 1999). Des Weiteren wurde demonstriert, dass Wechselwirkungen von murinen DCs und NK-Zellen zu einer Stimulation von proinflammatorischen Th1-Zellen und zu einer Th1-unabhängigen Aktivierung von Tumor-reaktiven CD8⁺ CTLs führen (Mocikat *et al.*, 2003; Adam *et al.*, 2005; Bajénoff *et al.*, 2006). Im humanen System konnte ebenfalls eine Aktivierung von NK-Zellen durch DCs gezeigt werden. Dabei stimulierten artifizielle humane DCs, welche aus CD14⁺ Monozyten oder CD34⁺ Stammzellen generiert wurden, die Proliferation, die IFN- γ -Produktion und die Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber Virus-infizierten Zellen und Tumorzellen (Moretta, 2005; Zitvogel *et al.*, 2006). Diese Effekte wurden unter anderem durch den direkten Zell-Zell-Kontakt zwischen NK-Zellen und DCs induziert. So interagierten MoDCs mit NK-Zellen durch Assoziation mit dem aktivierenden NK-Zell-Rezeptor NKp30. In diesem Zusammenhang wurde das zytotoxische Potential von NK-Zellen gegenüber unreifen MoDCs dokumentiert (Ferlazzo *et al.*, 2002; Vitale *et al.*, 2005). Außerdem ergaben *in vitro*-Experimente mit artifiziellen DCs, dass NK-Zellen durch Zytokine beeinflusst werden. DCs setzten beispielsweise IL-12, IL-15 oder IL-18 frei, welche die immunmodulatorischen und zytolytischen Aktivitäten von NK-Zellen fördern (Borg *et al.*, 2004; Ferlazzo *et al.*, 2004; Semino *et al.*, 2005). Darüber hinaus beeinflussten NK-Zellen den Phänotyp und die Funktion von *in vitro*-generierten DCs. So verstärkten voraktivierte NK-Zellen die Reifung und die Zytokinproduktion von MoDCs. Diese Interaktionen verbesserten die DC-vermittelte Aktivierung Antigen-spezifischer T-Lymphozyten (Gerosa *et al.*, 2002; Piccioli *et al.*, 2002; Vitale *et al.*, 2005).

1.5 Natürliche „Killer“-T (NKT)-Zellen

NKT-Zellen stellen eine einzigartige Immunzellpopulation dar, die Fähigkeiten von T-Lymphozyten und NK-Zellen vereinigt. NKT-Zellen entwickeln sich wie T-Lymphozyten im Thymus. Sie exprimieren den TCR-CD3-Komplex, unterscheiden sich jedoch von herkömmlichen T-Zellen durch die Expression von NK-Zell-Rezeptoren, wie CD56 und CD161 (Aldemir *et al.*, 2005; Kronenberg, 2005; Godfrey und Berzins, 2007). Die

Variabilität der TCRs, die bei T-Lymphozyten die Antigen-spezifische Erkennung einer Vielzahl von Pathogenen ermöglicht, ist bei NKT-Zellen stark eingeschränkt. Bei der größten humanen NKT-Zell-Subpopulation setzt der TCR sich aus den Ketten $V\alpha 24$ und $J\alpha 18$ zusammen, die mit der $V\beta 11$ -Kette assoziieren. NKT-Zellen, die diesen TCR-Typ exprimieren, werden als invariante NKT-Zellen bezeichnet (Mercer *et al.*, 2003; Van Kaer und Joyce, 2005; Lin *et al.*, 2006).

Im Gegensatz zu gewöhnlichen T-Zellen erkennen NKT-Zellen keine MHC-Peptid-Komplexe sondern Lipide, die von CD1d Molekülen auf Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) exprimiert werden. CD1d Moleküle weisen eine ähnliche Struktur wie MHC-Klasse I-Moleküle auf, ihre Bindungsgruben sind allerdings stark hydrophob und assoziieren mit Glykolipiden. Diese leiten sich von Mikroorganismen, Autoantigenen und Tumorzellen ab. Dazu gehören z. B. „borrelia burgdorferi glycolipid“ (BbFL)-IIc von *Borrelia burgdorferi*, „ α -galacturonosylceramide“ (α -GalACer) von *Spingomonas*-Stämmen oder endogenes humanes „isoglobotrihexosylceramide“ (iGb)-3. Ein viel versprechender synthetischer CD1d-Ligand ist „ α -galactosylceramide“ (α -GalCer), das eine sehr effiziente NKT-Zell-Aktivierung *in vitro* und *in vivo* bewirkt und dessen therapeutisches Potential zurzeit untersucht wird (Barral und Brenner, 2007; Stronge *et al.*, 2007; Van Kaer, 2007). Nach ihrer Antigen-vermittelten Aktivierung kennzeichnet NKT-Zellen eine schnelle und ausgeprägte Produktion von immunmodulatorischen Zytokinen, wie $IFN-\gamma$, GM-CSF, $TNF-\alpha$, IL-2, IL-4, IL-5 und IL-13. Die Mechanismen, die zu einer so schnellen Zytokinausschüttung führen, sind noch unbekannt. Es wird davon ausgegangen, dass einige Zytokine, wie IL-4 und $IFN-\gamma$, bereits im Ruhezustand als präformierte Moleküle vorliegen (Mercer *et al.*, 2004; Fujii *et al.*, 2007; Van Kaer, 2007). Neben der Antigenerkennung führen Zytokine, insbesondere IL-12, aber auch IL-15 und IL-18, zu einer Aktivierung von NKT-Zellen (Brigl, *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2004; Nagarajan und Kronenberg, 2007). Es wurde gezeigt, dass NKT-Zellen zytotoxische Effektormoleküle, wie Perforin, Granzym, TRAIL, Fas-Ligand und $TNF-\alpha$ synthetisieren und zu einer effizienten Lyse von Tumorzellen *in vitro* befähigt sind (Matarollo *et al.*, 2006; Seino *et al.*, 2006).

An Mausmodellen mit Karzinogen-induzierten Tumoren konnte eine Beteiligung von NKT-Zellen an der Induktion einer natürlichen antitumoralen Immunantwort dokumentiert werden (Smyth *et al.*, 2000; Crowe *et al.*, 2005; Ghiringhelli *et al.*, 2007). In weiteren Studien führte die Applikation von synthetischem α -GalCer zur Aktivierung von NKT-Zellen. Es zeigte sich, dass dieser Vorgang durch die DC-vermittelte Präsentation von α -GalCer in Form von CD1d-Lipid-Komplexen erfolgt. Die Aktivierung von NKT-Zellen bewirkte die Regression etablierter Tumore und inhibierte die Ausbildung von Metastasen (Toura *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2005; Chung *et al.*, 2007). Ausgehend von diesen

Beobachtungen wurde das Zytokinprofil von NKT-Zellen analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass Tumor-reaktive NKT-Zellen verstärkt IFN- γ produzieren. Die Sekretion von IFN- γ ermöglicht NKT-Zellen die Stimulation TAA-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten und CD8⁺ CTLs. NKT-Zellen fördern durch Freisetzung von IFN- γ auch das zytotoxische Potential von Tumor-reaktiven NK-Zellen (Smyth *et al.*, 2002; Shimizu *et al.*, 2007; Terabe und Berzofsky, 2007). Im Hinblick auf die Einbindung dieser Daten in die Immuntherapie von Tumoren zeigte sich, dass eine *ex vivo*-Beladung von DCs mit α -GalCer wesentlich effektiver ist, als die Vakzination mit dem löslichen Molekül (Fujii *et al.*, 2002; Giaccone *et al.*, 2002). Diese Erkenntnisse wurden auf das humane System transferiert und erste klinische Studien mit α -GalCer-aktivierten DCs durchgeführt. Die Behandlung von Patienten mit Kopf- und Halstumoren (Uchida *et al.*, 2007) sowie mit Melanomen, Brust- oder Prostatakarzinomen (Nieda *et al.*, 2004) ergab, dass bei einer Vakzination mit α -GalCer-beladenen DCs kaum Nebenwirkungen auftreten und die Induktion Tumorantigen-spezifischer T-Lymphozyten erfolgt.

1.6 Zielstellung

DCs nehmen eine Schlüsselposition bei der Aktivierung von Antigen-spezifischen CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Lymphozyten und damit bei der Induktion einer antitumoralen Immunantwort ein. Darüber hinaus ergaben sich Hinweise, dass murine DCs und artifizielle humane DCs, die in einem mehrtägigen Verfahren in Gegenwart verschiedener Zytokine aus CD14⁺ Monozyten oder CD34⁺ Stammzellen generiert wurden, zur Stimulation von NK-Zellen befähigt sind. Diese Daten lassen jedoch nur bedingt Rückschlüsse auf die *in vivo*-Situation im Menschen zu. Deshalb bestand ein wesentliches Ziel dieser Arbeit in der Analyse der Frage, ob frisch isolierte humane slanDCs, welche die größte DC-Subpopulation des Blutes repräsentieren, zur Aktivierung von NK-Zellen in der Lage sind. Zuerst sollte der Einfluss von slanDCs auf die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 sowie die Proliferation von NK-Zellen untersucht werden. Für die Aktivierung des zytolytischen Potentials von NK-Zellen spielt die Expression aktivierender Rezeptoren eine bedeutende Rolle. Deshalb waren die slanDC-vermittelten Veränderungen der Expression von aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren und Korezeptoren von großem Interesse. Die Wirkung von slanDCs auf die Produktion des immunmodulatorischen Zytokins IFN- γ durch NK-Zellen sollte analysiert werden, da IFN- γ proliferationshemmend auf Tumorzellen wirkt und die Aktivierung von Makrophagen und T-Lymphozyten fördert. Eine zentrale Funktion von NK-Zellen ist eine effiziente Lyse von Tumorzellen, deshalb stand die Analyse des slanDC-abhängigen zytotoxischen Potentials

von NK-Zellen im Mittelpunkt weiterer Experimente. In nachfolgenden Untersuchungen sollte evaluiert werden, ob NK-Zellen den Phänotyp und die Funktion von slanDCs beeinflussen. Die Ausreifung von slanDCs ist die Voraussetzung für eine Induktion von Tumor-spezifischen T-Lymphozyten, daher war die Wirkung von NK-Zellen auf die Maturierung von slanDCs von großer Bedeutung. SlanDCs sind in der Lage, durch Sekretion von immunmodulatorischen Zytokinen, wie IL-12 und IL-10, Effektorzellen des angeborenen sowie des erworbenen Immunsystems zu stimulieren oder zu inhibieren. Deshalb sollte die Wirkung von NK-Zellen auf das Zytokinprofil von slanDCs analysiert werden. Ob NK-Zellen die Fähigkeit von slanDCs zur Aktivierung und Differenzierung naiver CD4⁺ T-Lymphozyten beeinflussen, war ebenfalls von großem Interesse. Darüber hinaus sollten die zugrunde liegenden Mechanismen der Interaktionen zwischen slanDCs und NK-Zellen charakterisiert werden.

In den letzten Jahren wurde die herausragende Bedeutung von NKT-Zellen während der Therapie von Tumoren demonstriert. Bisher gibt es kaum Erkenntnisse darüber, wie native humane DCs und NKT-Zellen bei der Immunabwehr von Tumoren interagieren. Deshalb bilden die Wechselwirkungen zwischen slanDCs und NKT-Zellen einen zweiten Schwerpunkt dieser Arbeit. Dabei sollte der Einfluss von slanDCs auf NKT-Zellen durch die Analyse des Aktivierungszustandes und die Zytokinproduktion von NKT-Zellen evaluiert werden. Die Beeinflussung der Maturierung und der Zytokinsekretion von slanDCs durch NKT-Zellen stand im Mittelpunkt weiterer Experimente, da sie für die Aktivierung und Differenzierung von T-Lymphozyten von großer Bedeutung sind. Dabei sollten ebenfalls die zugrunde liegenden Mechanismen der Wechselwirkungen zwischen slanDCs und NKT-Zellen untersucht werden.

Die Analyse der Interaktionen von nativen DCs und NK-Zellen sowie DCs und NKT-Zellen kann einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der Immunabwehr von Tumoren leisten und die Konzeption neuer immuntherapeutischer Strategien für die Behandlung von Tumorpatienten ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

„Aqua ad iniectabilia“ (Aqua bidest.)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Biocoll Separating Solution (Ficoll-Trennlösung)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
D(+)-Glukose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat- Dodecahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol, absolut	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande
Kaliumchlorid	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm, Deutschland
Natriumcarbonat	Riedel-de Haen AG, Seelze, Deutschland
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchloridlösung, isotonisch [0,9%ig (w/v)]	Serum-Werk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland

Natriumcitratlösung	Baxter Deutschland GmbH, München-Unterschleißheim, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
OptiPhase SuperMix (Szintillationsflüssigkeit)	PerkinElmer Life Sciences, Rodgau-Jügesheim, Deutschland
Paraformaldehyd (Trockensubstanz)	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS (Trockensubstanz)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
2-Propanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure (95-97 %)	Riedel-de Haen-AG, Seelz-Hannover Deutschland
3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin -Tabletten	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypanblaulösung [0,5%ig (w/v)]	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Triton X-100	Ferak, Berlin, Deutschland
Tween 20	Serva, Heidelberg, Deutschland
Wasserstoffperoxid-Lösung (30%ig)	Klinik-Apotheke des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus, Dresden, Deutschland

2.1.2 Lösungen und Puffer

Auftaumedium (Zellkultur)	35 ml PBS-Lösung 10 ml humanes Serumalbumin (20%ig) 5 ml Natriumcitratlösung (4%ig) Lagerung: 4 °C
Beschichtungspuffer (ELISA)	1 l Lösung: 8,40 g Natriumhydrogencarbonat 10,50 g Natriumcarbonat 1 l Aqua dest. pH 9,5 Lagerung: 4 °C
Blockierungspuffer (ELISA)	PBS-Lösung mit 10 % FKS Lagerung: 4 °C
Isolationspuffer (Zellisolation)	100 ml Lösung: 97,5 ml PBS-Lösung 2 ml 100 mM EDTA-Lösung 0,5 g BSA Lagerung: 4 °C
Laufpuffer (Zellisolation)	1 l Lösung: 880 ml PBS-Lösung 20 ml 100 mM EDTA-Lösung 100 ml FKS Lagerung: 4 °C
Markierungspuffer (ELISA)	PBS-Lösung mit 10 % FKS Lagerung: 4 °C
PBS-Lösung	1 l Lösung: 9,55 g PBS (Trockensubstanz) 1 l Aqua dest.
Paraformaldehyd-Lösung (0,5%ig)	0,5 g Paraformaldehyd (Trockensubstanz) 100 ml PBS-Lösung

Reinigungspuffer (Zellisolation)	1 l Lösung: 700 ml Ethanol, absolut 300 ml Aqua dest. Lagerung: 4 °C
Spülpuffer (Zellisolation)	1 l Lösung: 980 ml PBS-Lösung 20 ml 100 mM EDTA-Lösung Lagerung: 4 °C
Stopplösung (ELISA)	1 M Schwefelsäure Lagerung: 4 °C
Substratpuffer-1 (ELISA)	100 ml Lösung: 24,3 ml 0,1 M Citronensäure- Monohydrat 27,8 ml 0,2 M Di-Natriumhydrogen- phosphat 50 ml Aqua dest. pH 5,0 Lagerung: 4 °C
Substratpuffer-2 (ELISA)	10 ml Substratpuffer-1 1 Tetramethylbenzidin-Tablette 3 µl Wasserstoffperoxid
Verdünnungspuffer (ELISA)	PBS-Lösung mit 10 % FKS Lagerung: 4 °C
Waschpuffer (ELISA)	PBS-Lösung mit 0,05 % Tween 20 Lagerung: 4 °C
Waschpuffer (Zellkultur)	500 ml PBS-Lösung 55 ml Natriumcitratlösung (4%ig) Lagerung: 4 °C
Wasch- und Messlösung (Durchflusssyztometrie)	PBS-Lösung mit 0,05 % Natriumazid (w/v)

2.1.3 Testkitsysteme

OptEIA-Set-Human IFN- γ	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
OptEIA-Set-Human IL-4	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
OptEIA-Set-Human IL-10	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
OptEIA-Set-Human IL-12p70	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland

2.1.4 Grundmedien und Medienzusätze

Amphotericin B (50 ng/ml)	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Bovines Serumsalbumin (BSA)	Gerbu Biotechnik GmbH, Geiberg, Deutschland
Cellgrowth-Medium	Cell Genix Technologietransfer GmbH, Freiburg, Deutschland
fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Humanserum (HS)	CC pro, Neustadt, Deutschland
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumchromat, Chromium-51 (^{51}Cr)	PerkinElmer Life Sciences, Rodgau- Jügesheim, Deutschland
Natriumpyruvat (100 mM)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Nichtessentielle Aminosäuren (NEA, 100 x)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland

Penicillin/Streptomycin (10000 µg/ml, 100 x)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Phorbol-12-Myristyl-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Maus-anti-human IL-12 Isotyp: IgG1κ	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Maus-anti-human IFN-γ Isotyp: IgG1κ	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Maus-IgG1κ Isotyp-Kontroll- Antikörper	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Rekombinanter humaner Stammzellfaktor (SCF)	Biosource International, Inc., USA
„Roswell Park Memorial Institute“ (RPMI) 1640-Medium	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Serumalbumin, humanes	Baxter Deutschland GmbH, Heidelberg, Deutschland
Stabiles Glutamin (N-Acetyl-L- Alanyl-L-Glutamin, 200 mM)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
[methyl,1',2'- ³ H]-Thymidin (³ H-Thymidin)	Amersham Biosciences, UK

2.1.5 Medienzusammensetzung

RPMI 1640, komplett

RPMI 1640-Medium (v/v)
 10 % FKS (v/v) oder 10 % HS (v/v)
 2 mM stabiles Glutamin
 1 mM Natriumpyruvat
 1 % nichtessentielle Aminosäuren
 (100 x) (v/v)
 100 µl/ml Penicillin/Streptomycin
 Lagerung: 4 °C

AML-Blasten-Kulturmedium,
 komplett

Cellgrowth-Medium
 50 ng SCF/ml
 Lagerung: 4 °C

2.1.6 Humane Tumorzellen

K562
 (Zelllinie aus dem Pleuraerguss
 eines Patienten mit CML)

ATCC Nummer: CCL 243

AML-Blasten (Primärzellen aus
 dem Blut von Patienten mit akuter
 myeloischer Leukämie)

Medizinische Klinik und Poliklinik I des
 Universitätsklinikums Carl Gustav
 Carus, Dresden

2.1.7 Antikörper und Antikörper-gekoppelte „microbeads“

2.1.7.1 Zellisolation

MACS naive CD4 ⁺ -T-Zell-Isolationskit, human	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS NK-Zell-Isolationskit II, human	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS NKT-Zell-Isolationskit, human	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS Ratten-anti-Maus-IgM-„microbeads“	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland
M-DC8, Klon 1D1 (1), Isotyp: IgM (10 µg/ml)	Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät, Technische Universität Dresden, Deutschland

2.1.7.2 Antikörper zur Charakterisierung von Oberflächenmolekülen und Vitalitätsmessungen

PE-markierter Maus-IgG1 Kontroll-Antikörper	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
FITC-markierter Maus-IgG1 Isotyp-Kontroll-Antikörper	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
PE-Cy5-markierter Maus-IgG1 Kontroll-Antikörper	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
PE-markierter Maus-IgG2a Kontroll-Antikörper	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
FITC-markierter Maus-IgG2a Kontroll-Antikörper	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

PE-Cy5-markierter Maus-IgG2a Kontroll-Antikörper	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PE-markierter Maus-IgM Kontroll- Antikörper Isotyp: IgG1 κ	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
FITC-markierter Maus-anti-human CD3-Antikörper Isotyp: IgG1 κ	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
FITC-markierter Maus-anti-human CD4-Antikörper Isotyp: IgG1 κ	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
PE-markierter Maus-anti-human CD45RA-Antikörper Isotyp: IgG2a	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
PE-markierter Maus-anti-human CD56-Antikörper Isotyp: IgG1 κ	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
PE-Cy-5-markierter Maus-anti- human CD56-Antikörper Isotyp: IgG1 κ	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
PE-Cy-5-markierter Maus-anti- human CD69-Antikörper Isotyp: IgG1 κ	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
PE-markierter Maus-anti-human CD83-Antikörper Isotyp: IgG1 κ	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
PE-markierter Maus-anti-human CD86-Antikörper Isotyp: IgG1 κ	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland

PE-markierter Maus-anti-human CD226-Antikörper (DNAM-1) Isotyp: IgG1 κ	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
PE-markierter Maus-anti-human CD244-Antikörper (2B4) Isotyp: IgG2	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
PE-Cy-5-markierter Maus-anti- human HLA-DR-Antikörper Isotyp: IgG2	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
FITC-markierter Maus-anti-human HLA-DR-Antikörper Isotyp: IgG2	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
PE-markierter Maus-anti-human NKp46-Antikörper Isotyp: IgG1	Beckman Coulter Company, Marseille, Frankreich
PE-markierter Maus-anti-human NKp44-Antikörper Isotyp: IgG1	Beckman Coulter Company, Marseille, Frankreich
PE-markierter Maus-anti-human NKp46-Antikörper Isotyp: IgG1	Beckman Coulter Company, Marseille, Frankreich
PE-markierter Maus-anti-human NKG2D-Antikörper Isotyp: IgG1	Beckman Coulter Company, Marseille, Frankreich
PE-markierter anti-Maus-IgM Goat F(ab') ₂ Fragment	Beckman Coulter Company, Marseille, Frankreich
7-AAD	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland

2.1.8 Geräte

AutoMACS	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Brutschrank (37 °C, 5 % CO ₂)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Durchflusszytometer (FACS)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Inotech-Harvester	PerkinElmer Life Sciences, Rodgau-Jügesheim, Deutschland
Micro Beta 1450 Trilux „Beta-Counter“	PerkinElmer Life Sciences, Rodgau-Jügesheim, Deutschland
Mikroskopsystem für Zellkulturen CK 30/CK 40	Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Deutschland
Milenia Kinetic Analyser (ELISA-„Reader“)	Milenia Biotec, Bad Nauheim, Deutschland

2.1.9 Sonstige Materialien

Einfriergefäße (1,8 ml)	Nalge Company, Rochester, New York
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,5 ml)	Eppendorf-Nethler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland
FACS-Messröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen (50 ml, 25 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen (250 ml, 75 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Glasfaserfilter (90 x 120 mm)	PerkinElmer Life Sciences, Rodgau-Jügesheim, Deutschland

Greiner-Röhrchen (15 ml/50ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
MACS Säulen, Füllmaterial: ferromagnetische Partikel	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
MeltiLex A, 73 x 109 mm (Szintillator-Folie)	PerkinElmer Life Sciences, Rodgau- Jügesheim, Deutschland
Millicell-HA® sterilisierter Kulturplatteneinsatz (0,45 µm)	Millipore, Bredford, USA
Multipipette	Eppendorf-Nethler-Hinz-GmbH, Hamburg Deutschland
Neubauer-Zählkammer	LO-Labortechnik GmbH, Friedrichsdorf, Deutschland
Pipettierhilfe	Eppendorf-Nethler-Hinz-GmbH, Hamburg Deutschland
Pipettensatz (0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 50-250 µl, 200-1000 µl)	Eppendorf-Nethler-Hinz-GmbH, Hamburg Deutschland
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Rundbodenplatten (96 Vertiefungen)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Spitzbodenplatten (96 Vertiefungen)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
„96 well BD Falcon™ ELISA Plates“	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturplatten (24 Vertiefungen)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellsieb (Porendurchmesser: 40 µm)	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, New Jersey

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes

Für die Isolation von slanDCs, CD56⁺ CD3⁻ NK-Zellen, naiven CD4⁺ T-Lymphozyten und CD56⁺ CD3⁺ NKT-Zellen wurden PBMCs aus aufkonzentriertem Spenderblut („Buffy-coat“) gewonnen, welches der Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes zur Verfügung stellte. Die Zellsuspension des „Buffy-coat“ wurde in eine 500 ml Glasflasche überführt und mit isotonischer Natriumchlorid-Lösung auf ein Volumen von 200 ml aufgefüllt. Je 100 ml der verdünnten Suspension wurden auf 100 ml Ficoll-Trennlösung geschichtet. Die Trennung der Zellpopulationen ermöglichte eine Dichtegradientenzentrifugation (20 min, 980 xg, RT). Aufgrund ihrer hohen Dichte durchwanderten Erythrozyten und polymorphkernige Zellen, wie Granulozyten, das Polydextran während der Zentrifugation. Dagegen bildeten PBMCs, die eine geringere Dichte aufwiesen, eine Interphase zwischen Ficoll-Trennlösung und zellfreiem Blutplasma-Natriumchlorid-Gemisch. Die PBMCs wurden separiert und mehrfach mit PBS-Lösung gewaschen (10 min, 360 xg, 4 °C). Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer erfolgte die Bestimmung der Zellzahl der PBMCs.

2.2.2 Isolation von 6-sulfo LacNAc⁺ dendritischen Zellen

Die gewonnenen PBMCs wurden zentrifugiert (10 min, 360 xg, 4 °C) und pro 1×10^7 Zellen in 200 µl Antikörperlösung aufgenommen. Die Antikörperlösung setzte sich aus dem Kulturüberstand des M-DC8-Hybridoms (Klon:1D1[1], Antikörperkonzentration: 10 µg/ml) und PBS-Lösung im Verhältnis von 1:25 zusammen. Diese Antikörper binden spezifisch die 6-sulfo LacNAc-Modifikation des PSGL-1 auf der Oberfläche von slanDCs. Die resuspendierten Zellen wurden 15 min auf Eis inkubiert, danach mit PBS-Lösung gewaschen (10 min, 360 xg, 4 °C) und in der zweiten Antikörperlösung resuspendiert. Deren Zusammensetzung bestimmte ebenfalls die Gesamtzellzahl der PBMCs. Für je 1×10^8 Zellen wurden 100 µl PBS-Lösung und 15 µl Ratten-anti-Maus-IgM-„microbead“-Lösung verwendet. Das Gemisch aus Zellen und Antikörper-Lösung wurde für 15 min auf Eis inkubiert. Es schloss sich ein Waschschrift an (10 min, 360 xg, 4 °C). Zur Vermeidung von Zellklumpen wurde die Suspension in 5 ml 2 mM EDTA-Lösung aufgenommen und durch ein Zellsieb (Porendurchmesser: 40 µm) filtriert. Die Isolation der Zellen im AutoMACS fand unter automatischer Verwendung von Lauf-, Spül- und Reinigungs-Puffer statt. Die Suspension der isolierten slanDCs wurde zentrifugiert und in 1 ml RPMI 1640-

Medium mit 10 % HS aufgenommen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Dieses Isolationsverfahren gewährleistete Reinheiten der slanDCs von >93 %. Der Anteil von slanDCs innerhalb der PBMCs eines Spenders betrug 0,6-2 %. Die frisch isolierten slanDCs wurden in Zellkulturplatten (96 oder 24 Vertiefungen) in RPMI 1640-Medium mit 10 % HS bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und nach 6 h mit 1 µg/ml LPS aktiviert.

2.2.3 Isolation von CD56⁺ CD3⁻ NK-Zellen und naiven CD4⁺ T-Lymphozyten

Die Isolation von CD56⁺ CD3⁻ NK-Zellen und naiven CD4⁺ T-Lymphozyten basierte auf dem Prinzip der negativen Depletion. Das verwendete Volumen der kommerziellen Antikörper-Lösungen richtete sich nach der Ausgangszellzahl. So wurden pro 1 x 10⁷ PBMCs 40 µl Isolationspuffer und 10 µl Antikörper-Cocktail eingesetzt. Dieser enthielt Antikörper mit Spezifitäten gegen alle nicht zu isolierenden Blutzellen. Die pelletierten Zellen (10 min, 360 xg, 4 °C) wurden in diesem Gemisch resuspendiert und 10 min bei 4 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 30 µl Isolationspuffer und 20 µl „microbead“-Lösung pro 1 x 10⁷ Zellen. Nach 15 min Inkubation bei 4 °C wurden die Zellen mit PBS-Lösung gewaschen (10 min, 360 xg, 4 °C) und in 1 ml 2 mM EDTA-Lösung aufgenommen. Die Isolation der Zellen nach dem Prinzip der negativen Depletion schloss sich unter automatischer Verwendung von Lauf-, Spül- und Reinigungs-Puffer im AutoMACS an. Die Isolation von CD56⁺ CD3⁻ NK-Zellen und naiven CD4⁺ T-Lymphozyten erfolgte mit einer Reinheit von >95 %. PBMCs enthielten 5-10 % CD56⁺ CD3⁻ NK-Zellen und etwa 10 % naive CD4⁺ T-Lymphozyten. Die genaue Zellzahl der einzelnen Populationen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. CD56⁺ CD3⁻ NK-Zellen und naive CD4⁺ T-Lymphozyten wurden in Zellkulturplatten (96 oder 24 Vertiefungen) in RPMI 1640-Medium mit 10 % HS bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.2.4 Isolation von CD56⁺ CD3⁺ NKT-Zellen

Zur Gewinnung von CD56⁺ CD3⁺ NKT-Zellen aus PBMCs wurden die Verfahren der negativen Depletion und positiven Selektion kombiniert. Als Basis dienten 1 x 10⁸ Zellen einer PBMC-Suspension, die in 400 µl Isolationspuffer und 100 µl kommerzieller CD56⁻ CD3⁻-Antikörperlösung aufgenommen wurden. Die Antikörperlösung ermöglichte eine Markierung der CD56- und CD3-negativen Zellen der Suspension. Die Zellen wurden für 10 min bei 4 °C inkubiert und danach mit PBS-Lösung gewaschen (10 min, 360 xg, 4 °C). Die pelletierten Zellen wurden in 400 µl Isolationspuffer und 100 µl anti-Biotin-

„microbead“-Lösung resuspendiert und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift (10 min, 360 xg, 4 °C) erfolgte die Anreicherung der CD56⁺ CD3⁺ Zellen durch negative Depletion mittels AutoMACS. Die gewonnenen Zellen wurden zentrifugiert (10 min, 360 xg, 4 °C) und mit 400 µl Isolationspuffer sowie 100 µl CD56-„microbeads“ resuspendiert und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen (10 min, 360 xg, 4 °C) und die CD56⁺ CD3⁺ NKT-Zellen mittels positivem Selektionsverfahren im AutoMACS unter automatischer Verwendung von Lauf-, Spül- und Reinigungs-Puffer isoliert. Diese Prozedur ermöglichte die Isolation von CD56⁺ CD3⁺ NKT-Zellen mit einer Reinheit von >90 %. NKT-Zellen umfassten 0,2 bis 1 % der PBMCs eines Spenders. Die exakte Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Kultur von NKT-Zellen erfolgte in Rundbodenplatten (96 Vertiefungen), RPMI 1640-Medium mit 10 % HS bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.2.5 Kultivierung der CML-Zelllinie K562

K562-Zellen stammen aus dem Pleuraerguss eines Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie. Die Langzeitlagerung der Tumorzellen erfolgte in flüssigem Stickstoff (-196 °C). Zum Schutz der Zellen enthielt das Medium 10 % DMSO. Nach dem Auftauen der K562-Zellen bei 37 °C im Wasserbad wurden sie mit 45 ml RPMI 1640-Medium mit 10 % FKS in ein 50 ml Greinerröhrchen überführt und anschließend zentrifugiert (10 min, 360 xg, RT). Das Pellet wurde in 1 ml RPMI 1640-Medium mit 10 % FKS resuspendiert und in eine Zellkulturflasche (Volumen: 50 ml, Fläche: 25 cm²) überführt, die bereits 10 ml Medium enthielt. Die Kultivierungszeit bei 37 °C und 5 % CO₂ richtete sich nach dem Wachstumsverhalten der Tumorzellen. Dementsprechend wurden die nicht adhärenen K562-Zellen mit dem Medium entnommen, in ein 50 ml Greinerröhrchen überführt und zentrifugiert (10 min, 360 xg, RT). Danach wurde ein Teil der Zellen in einer Zellkulturflasche (Volumen: 250 ml, Fläche: 75 cm²) mit 25 ml RPMI 1640-Medium mit 10 % FKS bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.2.6 Kultivierung von AML-Blasten

AML-Blasten stammen aus dem Blut von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie. Diese Primärzellen wurden von Mitarbeitern der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus gewonnen und charakterisiert. Die zur Verfügung gestellten AML-Blasten wiesen eine Reinheit von 83-93 % auf. Die Langzeitaufbewahrung der Blasten erfolgte in flüssigem Stickstoff (-196 °C). Die Zellen wurden bei 37 °C im

Wasserbad aufgetaut, in ein 50 ml Greinerröhrchen überführt und tropfenweise mit 50 ml Auftaumedium verdünnt. Die pelletierten Zellen (10 min, 360 xg, 4 °C) wurden in Waschpuffer aufgenommen und nach erneuter Zentrifugation (10 min, 360 xg, RT) mit 1 ml AML-Blasten-Kulturmedium in eine Zellkulturflasche (Volumen: 50 ml, Fläche: 25 cm²) überführt. In einem Gesamtvolumen von 8 ml AML-Blasten-Kulturmedium erfolgte die Kultur der Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.2.7 Durchflusszytometrie

Der „Fluorescence-activated cell sorter“ (FACS) ermöglicht die Charakterisierung von Zellen innerhalb einer Suspension gemäß ihrer Größe, Granularität und dem Vorhandensein spezifischer Oberflächenmoleküle nach entsprechender Färbung. Die Zellen werden durch hydrodynamische Fokussierung aneinandergereiht und mittels Laserstrahl analysiert. Jede Zelle streut den Lichtstrahl. Das Vorwärtsstreulicht gibt Aufschluss über ihre Größe und das Seitwärtsstreulicht charakterisiert ihre Granularität. Außerdem können Oberflächenmoleküle mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern markiert werden. Diese sind an Farbstoffe, wie Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) oder Phycoerythrin-Cy5 (PE-Cy5) gekoppelt, die bei Einwirkung des Laserstrahls zur Fluoreszenz angeregt werden. Des Weiteren wurden Zellen nach Färbung mit 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) im FACS quantifiziert. 7-AAD lagert sich nach dem Verlust der Zellmembranintegrität in die DNA toter Zellen ein.

Zellsuspensionen mit frisch isolierten oder kultivierten Zellen (Tab. 1) wurden in eine Spitzbodenplatte (96 Vertiefungen) überführt und mit 3 µl Antikörperlösung und/oder 5 µl 7-AAD vermischt. In einigen Versuchen erfolgte die Kombination von Antikörpern unterschiedlicher Spezifität, die mit verschiedenen Farbstoffen markiert waren. Dabei ermöglichte die Doppelfärbung mit anti-CD56-Antikörpern eine Abgrenzung der NK-Zellen oder NKT-Zellen von slanDCs. Die Analyse von slanDCs in Suspensionen mit NK- oder NKT-Zellen erfolgte im Rahmen einer Doppelfärbung mit anti-HLA-DR-Antikörpern. Das Zell-Antikörper-Gemisch wurde 15 min bei 4 °C unter Lichtabschluss inkubiert. Es schloss sich ein Waschschrift mit 100 µl Waschlösung (3 min, 360 xg, 4 °C) an. Die pelletierten Zellen wurden in 200 µl Messlösung aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen überführt. Verzögerte sich die Messung, konnten die markierten Zellen mit 200 µl 0,5%iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert werden. Die gefärbten Zellsuspensionen wurden im FACS gemessen und die gewonnenen Daten mit der Software WIN-MDI 2.8 ausgewertet. Die Darstellung der Zellen im Streubild, entsprechend ihrer Größe und Granularität, ermöglichte die Abtrennung einzelner Zellpopulationen voneinander und von toten Zellen. Die Definition von Regionen innerhalb des Streubildes gewährleistete die Analyse

einzelner Populationen im Histogramm. Die gefärbten Zellen wurden mit Zellen der gleichen Suspension verglichen, die mit so genannten Isotyp-Kontroll-Antikörpern gefärbt worden waren. Dabei handelt es sich um Farbstoff-markierte IgG-Antikörper, die keine Spezifitäten für die untersuchten Zellen besaßen. Sie veranschaulichten unspezifische Bindungen, garantierten die Trennung von gefärbten und ungefärbten Zellen und ermöglichten deren statistische Analyse innerhalb des Histogramms. Neben der prozentualen Verteilung wurde die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Zellen bestimmt. Sie repräsentiert den Mittelwert der Einzelfluoreszenzen aller Zellen einer definierten Population und somit die Expressionsdichte des Moleküls auf deren Oberfläche.

Tabelle 1: Experimenteller Aufbau der Versuche, deren Analyse im Durchflusszytometer erfolgte.

Versuch	Zellzahl pro Vertiefung	Beginn der Kokultur nach	Zugabe von LPS nach	Gesamtkultivierungsdauer
Aktivierungsmarker CD69 auf NK-Zellen	NK-Zellen: $2,5 \times 10^5$ DCs: 1×10^5	6 h	6 h	96 h
Aktivierende Rezeptoren auf NK-Zellen	NK-Zellen: $2,5 \times 10^5$ DCs: 1×10^5	6 h	6 h	96 h
7-AAD-Färbung von slanDCs	NK-Zellen: 4×10^5 DCs: 1×10^5	0 h	/	3, 6, 9, 12 h
Maturierung von slanDCs	NK-Zellen: $2,5 \times 10^5$ DCs: 1×10^5	0 h	/	24 h
Aktivierungsmarker CD69 auf NKT-Zellen	NK-Zellen: $2,5 \times 10^5$ DCs: 1×10^5	6 h	6 h	24 h
Maturierung von slanDCs	NKT-Zellen: 1×10^5 DCs: 1×10^5	0 h	/	24 h

2.2.8 „Enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA)

Der ELISA wurde zum quantitativen Nachweis von Zytokinen verwendet, welche die Zellen während der Kultur produzierten (Tab. 2). Zur Bestimmung der Konzentrationen von IFN- γ , IL-4, IL-10 und IL-12 wurden die Zellkulturüberstände nach Zentrifugation der Zellkulturplatten (5 min, 360 xg, 4 °C) geerntet und in 0,5 ml Eppendorfgefäße überführt, deren Lagerung bei -20 °C erfolgte. Trotz verschiedener Zytokinbestimmungen erlaubte die Standardisierung der Firma BD Biosciences Pharmingen die Verwendung gleicher Puffer und Lösungsvolumina für die verwendeten Nachweissysteme. Die Beschichtung von „96 well BD Falcon™ ELISA Plates“ mit 100 μ l „Capture-Antibody“-Lösung pro Vertiefung stand am Anfang der Prozedur. Diese Lösung enthielt Antikörper, die sich gegen das untersuchte humane Zytokin richteten und 250fach mit Beschichtungspuffer verdünnt wurden. Die Platte inkubierte bei 4 °C für etwa 18 h. Danach folgten das Entfernen der „Capture-Antibody“-Lösung und drei Waschschrte. Dabei wurde jede Vertiefung mit jeweils 300 μ l Waschpuffer gespült. Die Inkubation der Platten für 1 h bei RT, mit 200 μ l Blockierungspuffer pro Vertiefung, schloss sich an. Es folgten drei Waschschrte, wie bereits beschrieben. Die Proben und die Standardlösungen wurden vor dem Aufbringen auf die Platte verdünnt. Die Ausgangskonzentration der Standardlösung betrug 500 pg/ml und die Verdünnung 1:2, so dass eine Standardreihe mit den Konzentrationen 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6 und 7,8 pg/ml entstand. Als Null-Wert wurde Verdünnungspuffer verwendet, welcher auch zur Herstellung der jeweiligen Verdünnungsstufen der aufgetauten Proben diente. Pro Vertiefung wurde die Platte mit jeweils 100 μ l Standardlösung oder verdünnter Probe beladen und 2 h bei RT inkubiert. Es schlossen sich fünf Waschschrte mit Waschpuffer und 1 h Inkubation bei RT mit 100 μ l Markierungspuffer pro Vertiefung an, in dem „Detection-Antibody“-Lösung und Enzymreagenz 250fach verdünnt wurden. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgten sieben Waschschrte und der Zusatz von 100 μ l Substratpuffer-2 pro Vertiefung. Die ablaufende Farbreaktion erfolgte bei RT im Dunkeln und wurde nach 30 min durch Zugabe der Stopplösung beendet. Die photometrische Messung der optischen Dichte bei 450 nm ermöglichte die Berechnung der Zytokinkonzentrationen mit Hilfe der Standardreihe.

Tabelle 2: Experimenteller Aufbau der Versuche, in denen die Quantifizierung von Zytokinen mittels ELISA erfolgte.

Versuch	Zellzahl pro Vertiefung	Beginn der Kokultur nach	Zugabe von LPS nach	Gesamtkultivierungsdauer
IFN- γ -Produktion von NK-Zellen	NK-Zellen: $2,5 \times 10^5$ DCs: 1×10^5	6 h	6 h	96 h
IFN- γ -Produktion von NK-Zellen nach Blockade von IL-12	NK-Zellen: $2,5 \times 10^5$ DCs: 1×10^5	6 h	6 h	96 h
	Neutralisierende Antikörper: Maus-anti-human IL-12-Antikörper: 10 $\mu\text{g/ml}$ Maus-IgG1 κ Isotyp-Kontroll-Antikörper: 10 $\mu\text{g/ml}$			
IL-12-Produktion von slanDCs	NK/NKT-Zellen: $2,5 \times 10^5$ DCs: 1×10^5	0 h	6 h	24 h
IL-10-Produktion von slanDCs	NK/NKT-Zellen: $2,5 \times 10^5$ DCs: 1×10^5	0 h	6 h	48 h
IL-12-Produktion von slanDCs nach Blockade von IFN- γ	NK/NKT-Zellen: 1×10^5 DCs: 1×10^5	0 h	6 h	24 h
	Neutralisierende Antikörper: Maus-anti-human IFN- γ -Antikörper: 25 $\mu\text{g/ml}$ Maus-IgG1 κ Isotyp-Kontroll-Antikörper: 25 $\mu\text{g/ml}$			
IL-10-Produktion von slanDCs nach Blockade von IFN- γ	NK/NKT-Zellen: 1×10^5 DCs: 1×10^5	0 h	6 h	48 h
	Neutralisierende Antikörper: Maus-anti-human IFN- γ -Antikörper: 25 $\mu\text{g/ml}$ Maus-IgG1 κ Isotyp-Kontroll-Antikörper: 25 $\mu\text{g/ml}$			
IFN- γ /IL-4-Produktion von T-Zellen	NK-Zellen: $2,5 \times 10^4$ DCs: 1×10^4 T-Zellen: 1×10^6	0 h	6 h	8 Tage
	T-Zellen: 2×10^5	/	/	24 h
IFN- γ -Produktion von NKT-Zellen	NKT-Zellen: $2,5 \times 10^5$ DCs: 1×10^5	6 h	6 h	24 h
IFN- γ -Produktion von NKT-Zellen nach Blockade von IL-12	NKT-Zellen: $2,5 \times 10^5$ DCs: 1×10^5	6 h	6 h	24 h
	Neutralisierende Antikörper: Maus-anti-human IL-12-Antikörper: 10 $\mu\text{g/ml}$ Maus-IgG1 κ Isotyp-Kontroll-Antikörper: 10 $\mu\text{g/ml}$			
IL-4-Produktion von NKT-Zellen	NKT-Zellen: $2,5 \times 10^5$ DCs: 1×10^5	6 h	6 h	24 h

2.2.9 Proliferationstest mit [methyl,1',2'-³H]-Thymidin

Das Wachstumsverhalten von NK-Zellen wurde mittels [methyl,1',2'-³H]-Thymidin-Proliferationstest bestimmt. Thymidin ist ein von Thymin abgeleitetes Nukleosid. ³H-Thymidin wird von den Zellen aufgenommen und im Rahmen des Zellzyklus in die DNA eingebaut, somit ist die Menge an eingebautem radioaktiven Nukleosid direkt proportional zur Proliferationsrate der Zellen. Die Kokultivierung von NK-Zellen (1 x 10⁵ Zellen/Vertiefung) und ausgereiften slanDCs (1 x 10³, 3 x 10³, 1 x 10⁴ oder 3 x 10⁴ Zellen/Vertiefung) erfolgte mit oder ohne 1 µg/ml LPS in 200 µl RPMI 1640-Medium mit 10 % HS in einer Rundbodenplatte (96 Vertiefungen) bei 37 °C und 5 % CO₂. Dabei wurde jeder Ansatz als Dreifachbestimmung durchgeführt. Nach 72 h Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von 1 µCi ³H-Thymidin pro Vertiefung. Nach weiteren 24 h Kultivierung schloss sich die Ernte der Zellen mit Hilfe des „Inotech-Harvester“ an. Die Zellen wurden mit destilliertem Wasser auf einen Glasfaserfilter aufgebracht, was zur Lyse der Zellen und zur Freisetzung der ³H-Thymidin-markierten DNA führte. Der Glasfaserfilter wurde bei 70 °C im Wärmeschrank getrocknet. Die Szintillator-Folie wurde bei 70 °C auf den Glasfaserfilter aufgebracht und ermöglichte die Messung der Proben im „β-Counter“. Die Quantifizierung des Proliferationsverhaltens von NK-Zellen erfolgte entsprechend des Einbaus von ³H-Thymidin in die DNA.

2.2.10 Chromfreisetzungstest

Um die Zytotoxizität von NK-Zellen (2,5 x 10⁵ Zellen/Vertiefung) zu untersuchen, wurden diese mit ausgereiften slanDCs (1 x 10⁵ Zellen/Vertiefung) in An- oder Abwesenheit von 1 µg/ml LPS in 200 µl RPMI 1640-Medium mit 10 % HS in einer Rundbodenplatte (96 Vertiefungen) bei 37 °C und 5 % CO₂ für 96 h kokultiviert. Danach wurden die NK-Zellen durch vorsichtiges Resuspendieren von den adhärennten slanDCs isoliert und in verschiedenen Verhältnissen mit K562-Zellen (5 x 10³ Zellen/Vertiefung) oder AML-Blasten (5 x 10³ Zellen/Vertiefung) kultiviert. Die Tumorzellen wurden im Vorfeld für 1 h in 100 µCi ⁵¹Cr pro 1 x 10⁶ Zellen inkubiert. Die Freisetzung des ⁵¹Cr erfolgte deshalb bei Lyse der Tumorzellen. Die Kokultur von NK-Zellen und Tumorzellen fand für 4 h in Rundbodenplatten (96 Vertiefungen), RPMI 1640-Medium mit 10 % HS bei 37 °C und 5 % CO₂ statt. Anschließend wurden die Platten zentrifugiert (5 min, 360 xg, 4 °C) und die Zellkulturüberstände gewonnen. Es wurden 25 µl jeder Probe mit 150 µl Szintillationsflüssigkeit vermischt und das freigesetzte ⁵¹Cr in „counts per minute“ (cpm) mittels „β-Counter“ gemessen. Zur Berechnung der prozentualen Freisetzung des ⁵¹Cr

wurden zwei Kontrollen benötigt, die spontane und die maximale Chrom-Freisetzung. Dabei repräsentieren die Werte des Überstandes unbehandelter Zellen die spontane ^{51}Cr -Freisetzung. Die maximale ^{51}Cr -Freisetzung wurde nach der Lyse aller Tumorzellen eines Ansatzes durch die Zugabe von Triton X-100 (2,5 % (v/v)) bestimmt. Die Berechnung der spezifischen Lyse der Proben erfolgte mit folgender Formel:

$$\text{spezifische Lyse [\%]} = 100 \times \frac{[\text{cpm experimentelle Freisetzung} - \text{cpm spontane Freisetzung}]}{[\text{cpm maximale Freisetzung} - \text{cpm spontane Freisetzung}]}$$

2.2.11 Programmierung naiver CD4^+ T-Lymphozyten

Die Quantifizierung von $\text{IFN-}\gamma$ und IL-4 beschreibt die DC-vermittelte Differenzierung von naiven CD4^+ T-Lymphozyten in Th1- oder Th2-Zellen. Dazu wurden slanDCs, NK-Zellen und naive CD4^+ T-Lymphozyten isoliert. SlanDCs (1×10^5 Zellen/Vertiefung) wurden mit naiven CD4^+ T-Zellen (1×10^6 Zellen/Vertiefung) und 400 μl RPMI 1640-Medium mit 10 % HS in eine Zellkulturplatte (24 Vertiefungen) gegeben. In jede Vertiefung wurde ein Kulturplatteneinsatz gestellt, der eine Membran enthielt. Deren Porengröße von 0,45 μm ermöglichte zwar die Diffusion löslicher Moleküle, verhinderte aber den direkten Zell-Zell-Kontakt (Abb. 3). Auf die Membran des Kulturplatteneinsatzes wurden 300 μl RPMI 1640-Medium mit 10 % HS und NK-Zellen ($2,5 \times 10^5$ Zellen/Vertiefung) mit oder ohne slanDCs (1×10^5 Zellen/Vertiefung) gegeben. Nach 6 h Kokultur wurde 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS hinzugefügt. Es schloss sich eine Gesamtinkubationszeit von 8 Tagen an. Danach wurden die CD4^+ T-Zellen durch das Entfernen des Kulturplatteneinsatzes von den NK-Zellen getrennt und mit einer Reinheit von >90 % isoliert. Die CD4^+ T-Zellen (2×10^5 Zellen/Vertiefung) wurden in eine Rundbodenplatte (96 Vertiefungen) überführt und mit 10 ng/ml PMA und 1 $\mu\text{g/ml}$ Ionomycin stimuliert. Die Überstände der CD4^+ T-Zellen wurden nach 24 h geerntet und die Konzentrationen von $\text{IFN-}\gamma$ und IL-4 mittels ELISA bestimmt.

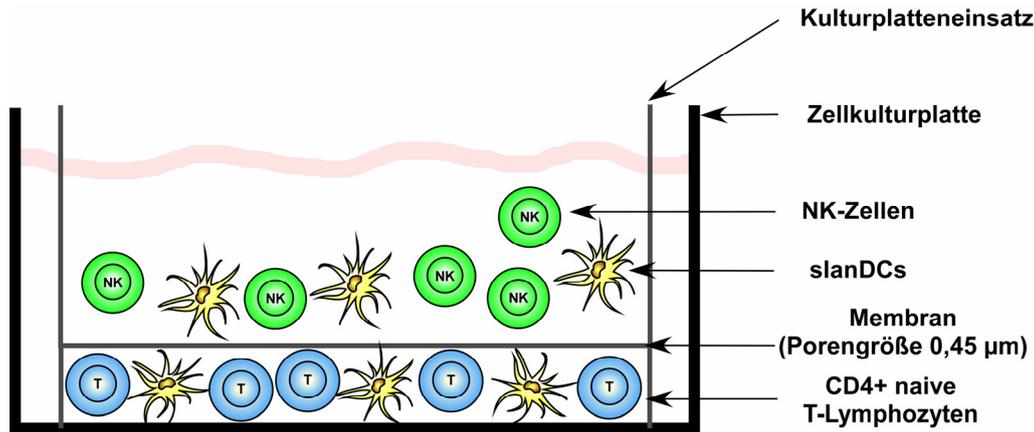


Abbildung 3: Schematischer Versuchsaufbau zur Analyse der Programmierung von T-Zellen.

Naive CD4⁺ T-Lymphozyten und slanDCs einerseits sowie NK-Zellen und slanDCs andererseits wurden mit Hilfe eines Kulturplatteneinsatzes getrennt, dessen Membran verhinderte zwar Zell-Zell-Kontakte erlaubte aber die Passage löslicher Moleküle.

2.2.12 Statistik

Die statistische Beurteilung der gewonnenen Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism Version 4.0 in Absprache mit Herrn Dipl.-Math. E. Kuhlisch vom Institut für Medizinische Informatik und Biometrie der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus, Dresden. Die Ergebnisse zur Quantifizierung von Zytokinen, zum Proliferationsverhalten von NK-Zellen und zur spezifischen Lyse von Tumorzellen sind als arithmetische Mittelwerte aus Doppel- oder Dreifachbestimmungen dargestellt. Zusätzlich wurden die Standardabweichungen dieser Mittelwerte berechnet. Aufgrund der biologischen Schwankungen ist eine zusammenfassende Darstellung der Daten der untersuchten Spender nicht möglich, deshalb wurde repräsentativ das Ergebnis eines Spenders abgebildet. Basierend auf der Anzahl der Einzelmessungen wurde der Welch t-Test unter der Annahme angewendet, dass die Stichproben einer Grundgesamtheit mit normalverteilten oder annähernd normalverteilten Zufallsgrößen vorliegen. Die Nullhypothese $H_0: \mu_1 = \mu_2$ beschreibt die Gleichheit zweier Messwertreihen, während die Alternativhypothese $H_A: \mu_1 \neq \mu_2$ von einem Unterschied der beiden Größen ausgeht. Zur Analyse der Hypothesen wurden die Welch t-Verteilung und der Freiheitsgrad der beiden Grundgesamtheiten berechnet. Sie gaben Aufschluss über die Wahrscheinlichkeit p , mit der die Nullhypothese zutreffend ist. Das Signifikanzniveau ist in den graphischen Darstellungen der Ergebnisse wie folgt angegeben:

*	$p \leq 0,05$	signifikant
**	$p \leq 0,01$	hoch signifikant

3 Ergebnisse

3.1 Analyse des Einflusses von slanDCs auf NK-Zellen

3.1.1 Wirkung von slanDCs auf die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf NK-Zellen

SlanDCs bilden die größte Subpopulation humaner Blut-DCs, die sich von anderen DC-Subpopulationen durch eine 6-sulfo LacNAc-Glycosylierung auf PSGL-1 unterscheidet. Diese spezifische Modifikation ermöglicht die Isolation von slanDCs und somit deren phänotypische und funktionelle Charakterisierung. Es stellte sich heraus, dass slanDCs effiziente Stimulatoren von Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Lymphozyten und Tumor-reaktiven CD8⁺ CTLs sind (Schäkel *et al.*, 1998; Schäkel *et al.*, 2006). Ob slanDCs Effektorzellen des angeborenen Immunsystems ebenso effektiv stimulieren, sollte in dieser Arbeit geklärt werden. Daher wurde der Einfluss von slanDCs auf NK-Zellen evaluiert. Aktivierte NK-Zellen zeichnen sich durch ihr direktes zytotoxisches Potential gegenüber Tumorzellen und die Sekretion immunmodulatorischer Zytokine aus. Der Aktivierungszustand von NK-Zellen wird durch die Expression des Oberflächenmarkers CD69 charakterisiert. Deshalb wurde analysiert, ob slanDCs die Expression von CD69 auf NK-Zellen beeinflussen. CD69 wird auch als „very early activation antigen“ oder „activation inducer molecule“ bezeichnet und während der Aktivierung von NK-Zellen verstärkt exprimiert (Marzio *et al.*, 1999; Hébert, 2000). Für die Analyse der CD69-Expression erfolgte die immunomagnetische Isolation von slanDCs und NK-Zellen aus dem Blut gesunder Spender mit einer Reinheit von >93 % (Gliederungspunkte 2.2.2 und 2.2.3). SlanDCs wurden für 6 h in Abwesenheit von exogenen Stimulatoren inkubiert, bevor autologe NK-Zellen hinzugegeben wurden. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Gegenwart von LPS, nachdem Studien unserer Arbeitsgruppe demonstriert hatten, dass LPS ein effizienter Aktivator von slanDCs ist (Schäkel *et al.*, 2002). Nach insgesamt 96 h Kokultur wurde die Expression von CD69 auf NK-Zellen im Durchflusszytometer bestimmt (Gliederungspunkt 2.2.7). Als Ergebnis zeigte sich, dass LPS-stimulierte slanDCs den Prozentsatz CD69-exprimierender NK-Zellen deutlich steigern (Abb. 4, E). Darüber hinaus wurde die Expressionsdichte von CD69 auf der Oberfläche von NK-Zellen erhöht. Dagegen beeinflussten unstimulierte slanDCs die Expression von CD69 nicht (Abb. 4, D). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass stimulierte slanDCs zu einer Steigerung des Aktivierungszustandes von NK-Zellen in der Lage sind.

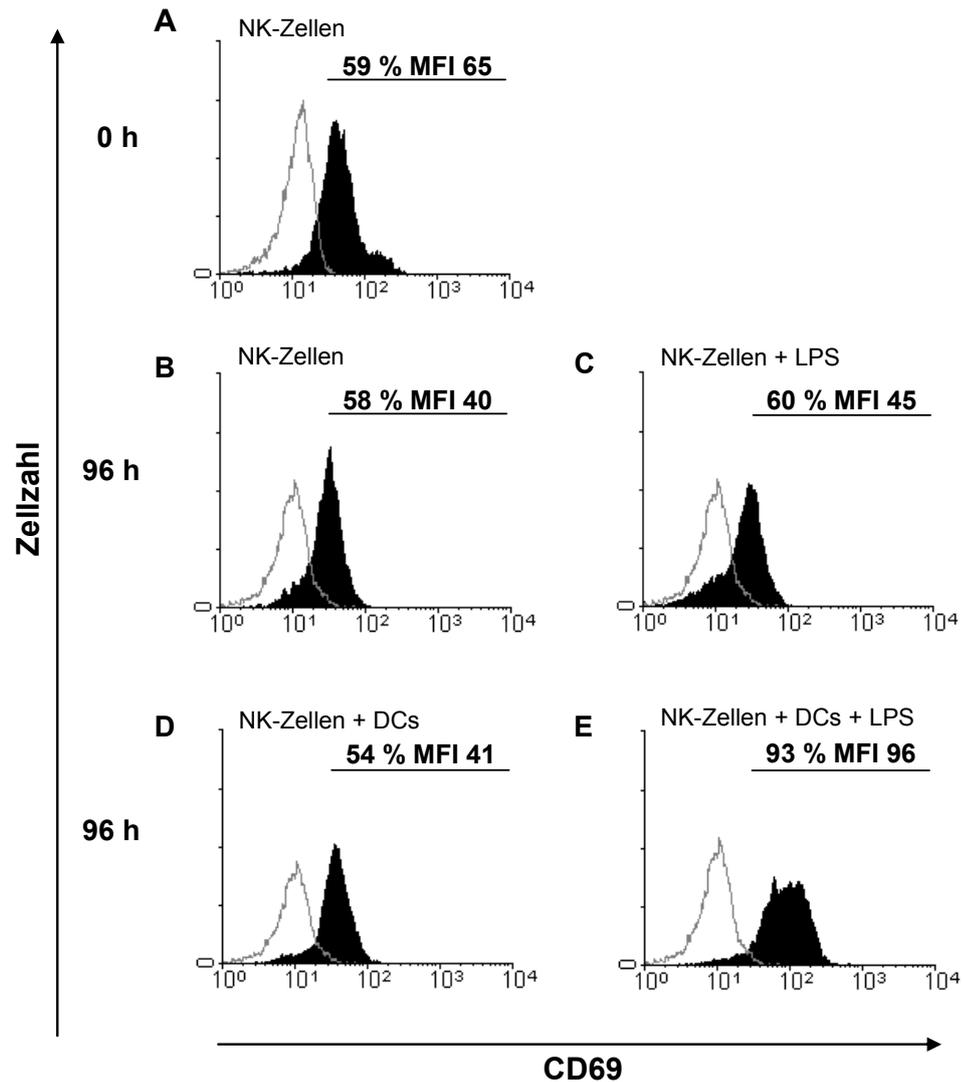


Abbildung 4: Wirkung von slanDCs auf die Expression von CD69 auf NK-Zellen. NK-Zellen ($2,5 \times 10^5$) wurden in Abwesenheit (B, C) oder in Gegenwart (D, E) von ausgereiften slanDCs (1×10^5) mit (C, E) oder ohne (B, D) LPS kultiviert. Die Analyse von CD69 erfolgte nach 0 h (A) und 96 h (B-E). Die Isotypkontrolle (grauer Graph) und die mit anti-CD69-Antikörpern gefärbten NK-Zellen (schwarzer Graph) sind dargestellt. Außerdem werden der MFI-Wert und die Prozentzahl CD69-exprimierender NK-Zellen unter Berücksichtigung der Isotypkontrolle gezeigt. Es ist ein repräsentativer von fünf untersuchten Spendern angegeben.

3.1.2 Einfluss von slanDCs auf das Proliferationsverhalten von NK-Zellen

Für die effektive Elimination von Tumoren ist die Proliferation aktivierter NK-Zellen von großer Bedeutung. Aus diesem Grund wurde in einem ^3H -Thymidin-Test untersucht, ob slanDCs das Proliferationsverhalten von NK-Zellen modulieren. Dazu erfolgte die Kultur von NK-Zellen und maturaen slanDCs in An- oder Abwesenheit von LPS. Nach 72 h Kokultur wurde ^3H -Thymidin hinzugegeben und dessen Einbau nach Ablauf der Inkubationszeit von insgesamt 96 h gemessen (Gliederungspunkt 2.2.9). Die Daten ergaben, dass ausschließlich LPS-stimulierte slanDCs eine signifikante Erhöhung der Proliferation von NK-Zellen induzierten (Abb. 5). Dabei nahm der ^3H -Thymidineinbau von NK-Zellen mit steigenden slanDC-Zahlen zu. Dagegen führte die Kokultur von NK-Zellen und unstimulierten slanDCs zu keiner Steigerung der NK-Zell-Proliferation. Die alleinige Kultivierung von slanDCs oder NK-Zellen führte zu keinem wesentlichen ^3H -Thymidineinbau (<1000 cpm).

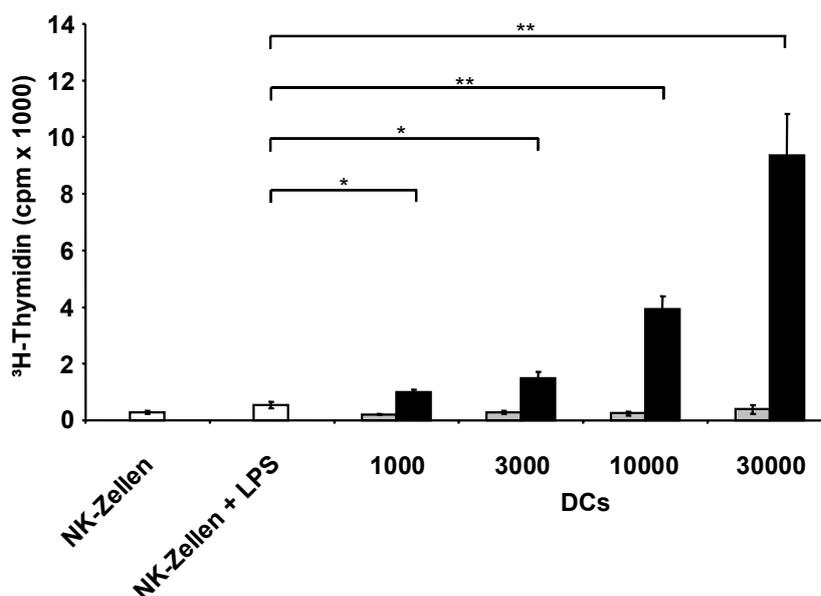


Abbildung 5: Einfluss von slanDCs auf die Proliferation von NK-Zellen.

NK-Zellen (1×10^5) wurden mit maturaen slanDCs in An- oder Abwesenheit von LPS kultiviert. Im Rahmen eines ^3H -Thymidin-Proliferationstestes wurde nach 72 h ^3H -Thymidin zugegeben und nach weiteren 24 h die Inkorporation des Nukleosids gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung, deren Standardabweichungen und die statistische Signifikanz (** $p \leq 0,05$; * $p \leq 0,05$). Von vier untersuchten ist ein repräsentativer Spender dargestellt.

3.1.3 Modulation der Expression aktivierender Rezeptoren auf NK-Zellen durch slanDCs

Vor einiger Zeit wurde die zentrale Rolle von aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren bei der NK-Zell-vermittelten Lyse von Tumorzellen dokumentiert (Bryceson *et al.*, 2006 B; Moretta *et al.*, 2006). Deshalb erfolgte in dieser Arbeit erstmals die Analyse des Einflusses von nativen DCs auf die Expression von aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren. Zu den wichtigsten aktivierenden Rezeptoren gehören die Mitglieder der NCR-Familie (NKp46, NKp44, NKp30) sowie NKG2D. Für die Analyse dieser Rezeptoren wurden slanDCs sowie NK-Zellen isoliert und nach Ausreifung der slanDCs kokultiviert. Die Charakterisierung der aktivierenden Rezeptoren auf der Oberfläche von NK-Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie (Gliederungspunkt 2.2.7). Dabei zeigte sich, dass LPS-aktivierte slanDCs zu einer deutlichen Erhöhung der Expressionsdichte von NKp46, NKp44 und NKp30 auf der Oberfläche von NK-Zellen führen (Abb. 6-8, E). Darüber hinaus verstärkten LPS-stimulierte slanDCs den prozentualen Anteil von NKp44- und NKp30-exprimierenden NK-Zellen. Im Gegensatz dazu hatten aktivierte slanDCs keinen Einfluss auf die Expression von NKG2D auf NK-Zellen (Abb. 9, E). In allen Untersuchungen bewirkten unstimulierte slanDCs keine Veränderungen der Expression von NK-Zell-Rezeptoren (Abb. 6-9, D).

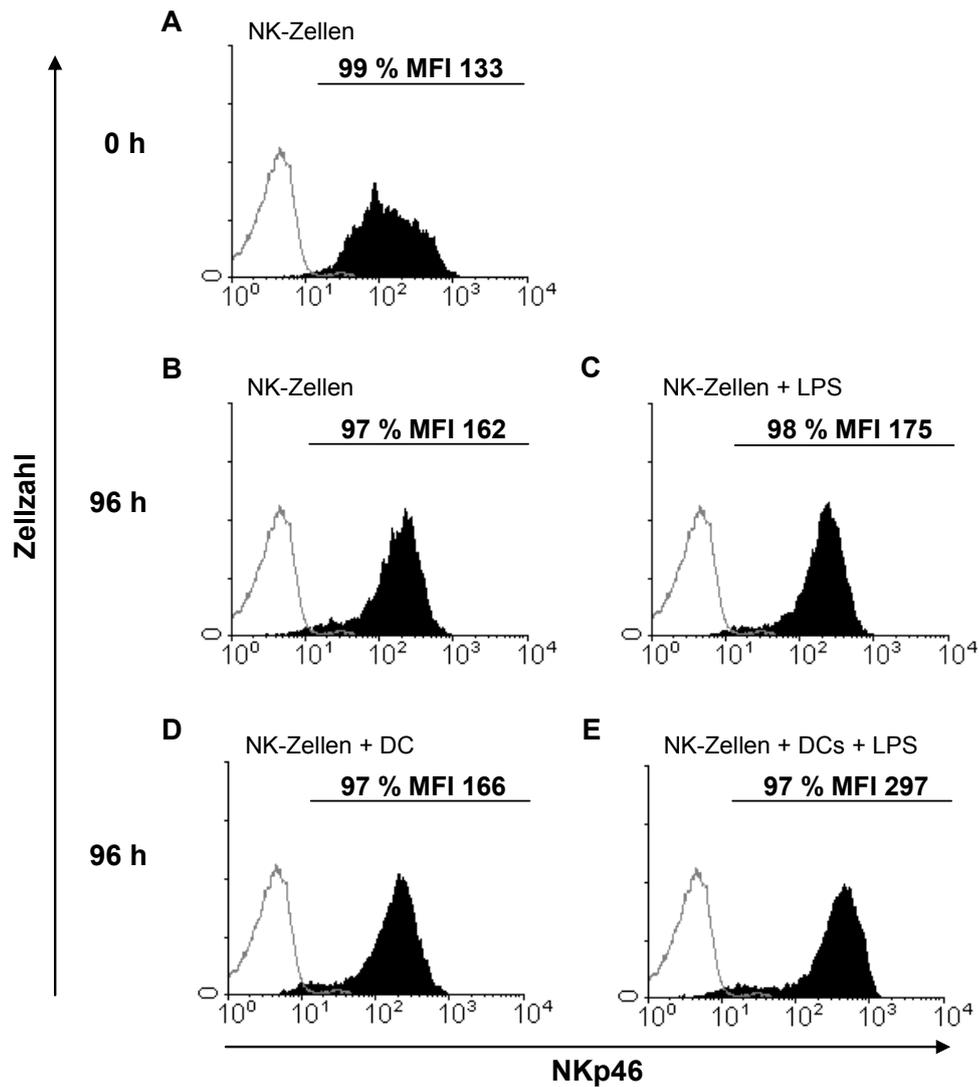


Abbildung 6: slanDC-beeinflusste Expression von NKp46 auf NK-Zellen.

NK-Zellen ($2,5 \times 10^5$) wurden in Ab- (B, C) oder Anwesenheit (D, E) von ausgereiften slanDCs (1×10^5) mit (C, E) oder ohne (B, D) LPS kultiviert. Nach 0 h (A) und 96 h (B-E) erfolgte die Detektion von NKp46 auf der Oberfläche von NK-Zellen im Durchflusszytometer. Abgebildet sind die Isotypkontrolle (grauer Graph) und die mit anti-NKp46-Antikörpern gefärbten NK-Zellen (schwarzer Graph). Außerdem werden der MFI-Wert und die Prozentzahl NKp46-exprimierender NK-Zellen unter Berücksichtigung der Isotypkontrolle gezeigt. Ein repräsentativer von fünf untersuchten Spendern ist angegeben.

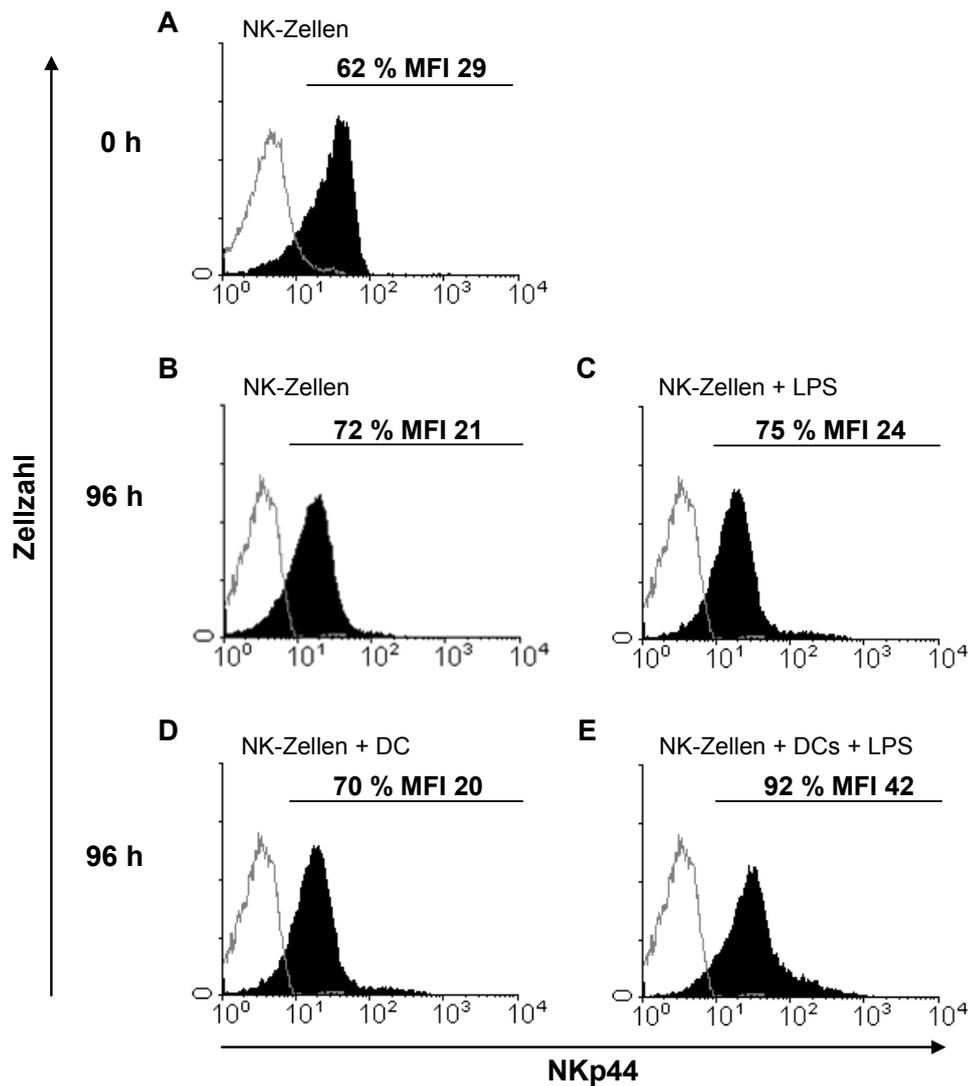


Abbildung 7: Wirkung von slanDCs auf die NKp44-Expression von NK-Zellen. NK-Zellen ($2,5 \times 10^5$) wurden in Abwesenheit (B, C) oder Gegenwart (D, E) von muren slanDCs (1×10^5) mit (C, E) oder ohne (B, D) LPS kultiviert. Die Analyse der Zellen erfolgte nach 0 h (A) und 96 h (B-E). Die Isotypkontrolle (grauer Graph) und die mit anti-NKp44-Antikörpern gefärbten NK-Zellen (schwarzer Graph) werden gezeigt. Der MFI-Wert und die Prozentzahl der NKp44-exprimierenden NK-Zellen sind unter Berücksichtigung der Isotypkontrolle abgebildet. Von fünf untersuchten ist ein repräsentativer Spender dargestellt.

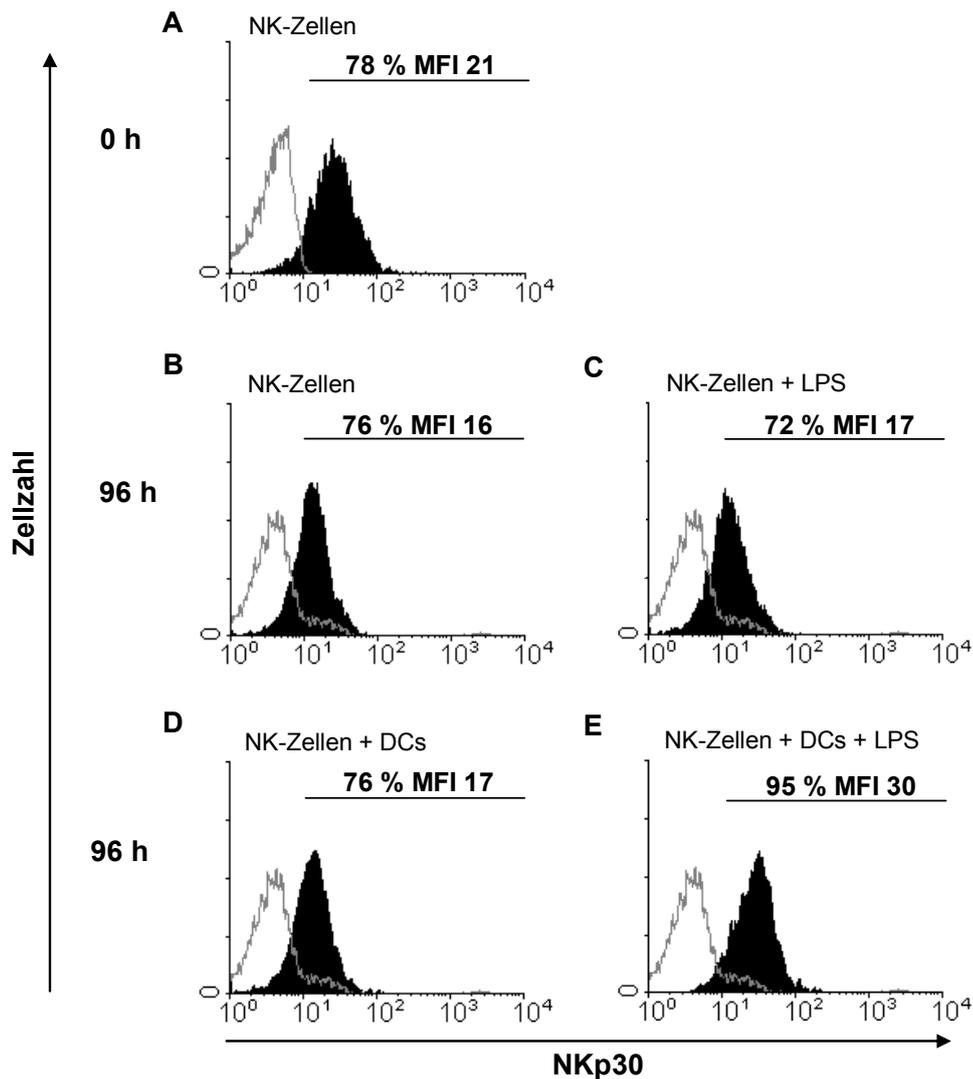


Abbildung 8: Einfluss von slanDCs auf die NKp30-Expression von NK-Zellen. NK-Zellen ($2,5 \times 10^5$) wurden in Ab- (B, C) oder Anwesenheit (D, E) von ausgereiften slanDCs (1×10^5) mit (C, E) oder ohne (B, D) LPS kultiviert. Die Analyse von NKp30 erfolgte nach 0 h (A) und 96 h (B-E). Dargestellt sind die Isotypkontrolle (grauer Graph) und die mit anti-NKp30-Antikörpern gefärbten NK-Zellen (schwarzer Graph). Außerdem werden der MFI-Wert und die Prozentzahl der NKp30-exprimierenden NK-Zellen unter Berücksichtigung der Isotypkontrolle gezeigt. Von fünf untersuchten ist ein repräsentativer Spender abgebildet.

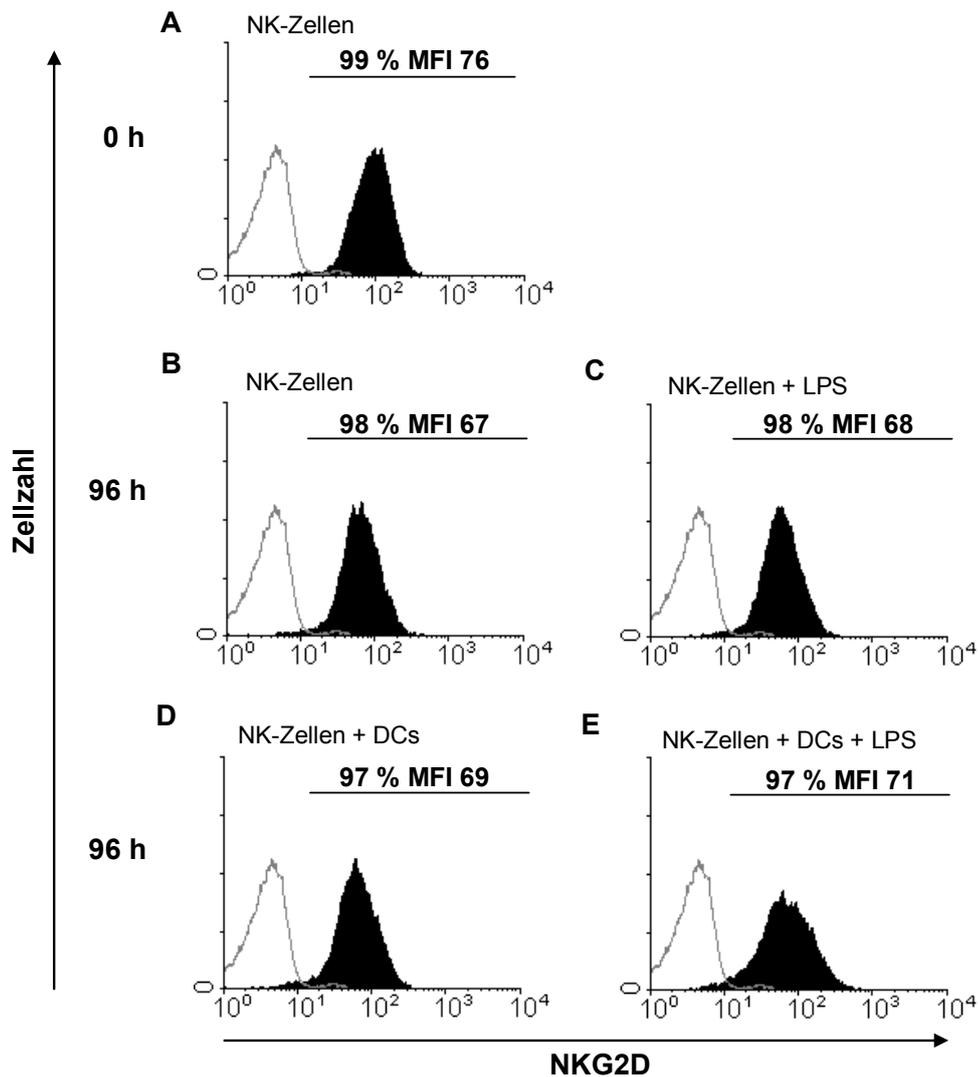


Abbildung 9: Expression von NKG2D auf NK-Zellen nach Kokultur mit slanDCs. NK-Zellen ($2,5 \times 10^5$) wurden in Ab- (B, C) oder Anwesenheit (D, E) von muren slanDCs (1×10^5) mit (C, E) und ohne (B, D) LPS kultiviert. Nach 0 h (A) und 96 h (B-E) erfolgte die Detektion von NKG2D auf der Oberfläche von NK-Zellen im Durchflusszytometer. Abgebildet sind die Isotypkontrolle (grauer Graph) und die mit anti-NKG2D-Antikörpern gefärbten NK-Zellen (schwarzer Graph). Außerdem werden der MFI-Wert und die Prozentzahl NKG2D-exprimierender NK-Zellen unter Berücksichtigung der Isotypkontrolle gezeigt. Von vier untersuchten ist ein repräsentativer Spender dargestellt.

Die Wirkung aktivierender NK-Zell-Rezeptoren kann durch Korezeptoren, wie 2B4 und DNAM-1, verstärkt werden. 2B4 erhöht durch Bindung an seinen Liganden, CD48, die aktivierenden Signale von NKp46 und NKG2D, während DNAM-1 nach Assoziation mit PVR oder Nektin 2 die Wirkung von NKp30 potenzieren kann (Bryceson *et al.*, 2006 A). Ob slanDCs die Expression von Korezeptoren auf NK-Zellen beeinflussen, wurde im Durchflusszytometer bestimmt, nachdem NK-Zellen und ausgereifte slanDCs mit oder ohne LPS kokultiviert wurden (Gliederungspunkt 2.2.7). Die Daten belegten, dass LPS-stimulierte slanDCs den prozentualen Anteil der 2B4-exprimierenden NK-Zellen steigern (Abb. 10, E). Außerdem verstärkten aktivierte slanDCs die Expressionsdichte von DNAM-1 auf der Oberfläche von NK-Zellen (Abb. 11, E). Dagegen waren unstimulierte slanDCs nicht in der Lage, die Expression der Korezeptoren auf NK-Zellen zu modulieren (Abb. 10 und 11, D). Die Ergebnisse zeigten, dass LPS-aktivierte slanDCs nicht nur die Expression von aktivierenden Rezeptoren, sondern auch von Korezeptoren auf NK-Zellen verstärken.

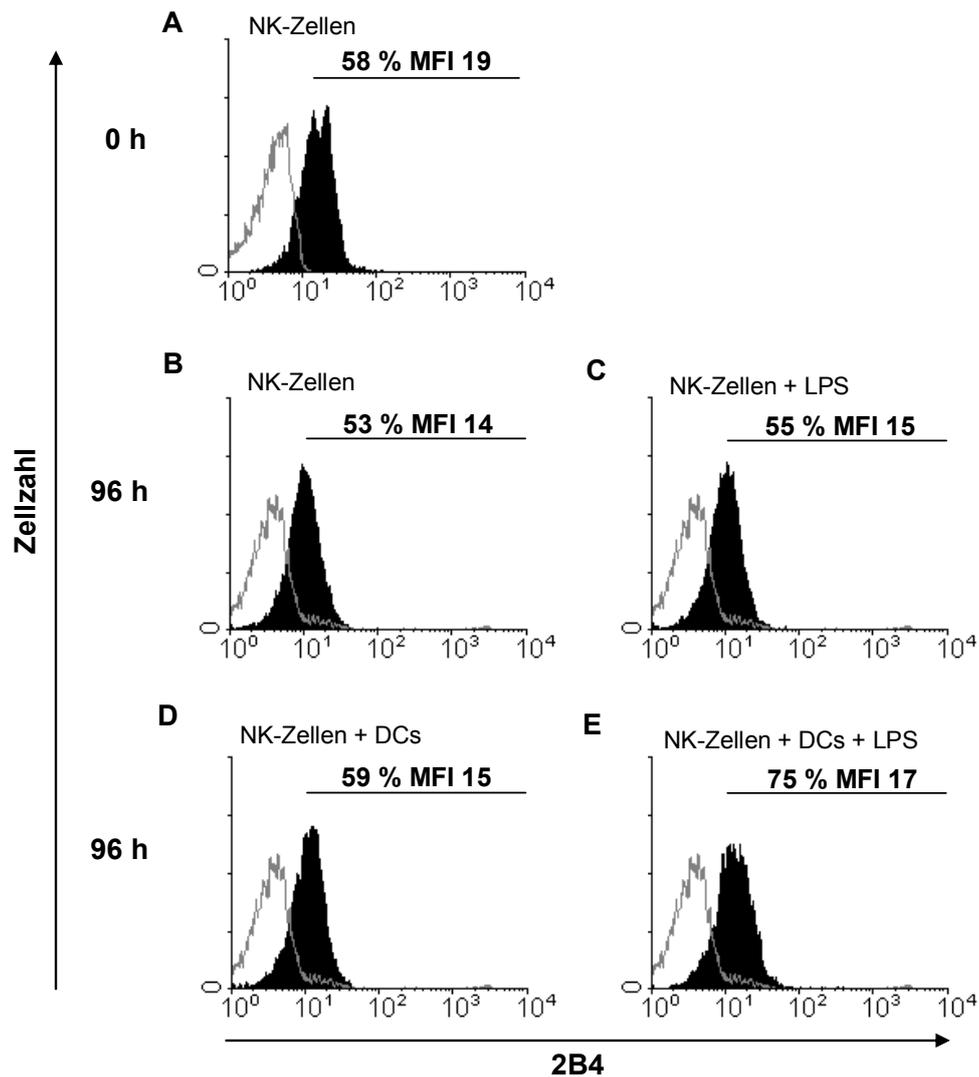


Abbildung 10: Wirkung von slanDCs auf die 2B4-Expression von NK-Zellen. NK-Zellen ($2,5 \times 10^5$) wurden ohne (B, C) oder mit (D, E) ausgereiften slanDCs (1×10^5) in An- (C, E) oder Abwesenheit (B, D) von LPS inkubiert. Nach 0 h (A) und 96 h (B-E) wurde die Expression von 2B4 auf NK-Zellen im Durchflusszytometer gemessen. Gezeigt werden die Isotypkontrolle (grauer Graph) und die mit anti-2B4-Antikörpern gefärbten NK-Zellen (schwarzer Graph). Außerdem sind der MFI-Wert und die Prozentzahl der 2B4-exprimierenden NK-Zellen unter Berücksichtigung der Isotypkontrolle dargestellt. Von vier untersuchten ist ein repräsentativer Spender abgebildet.

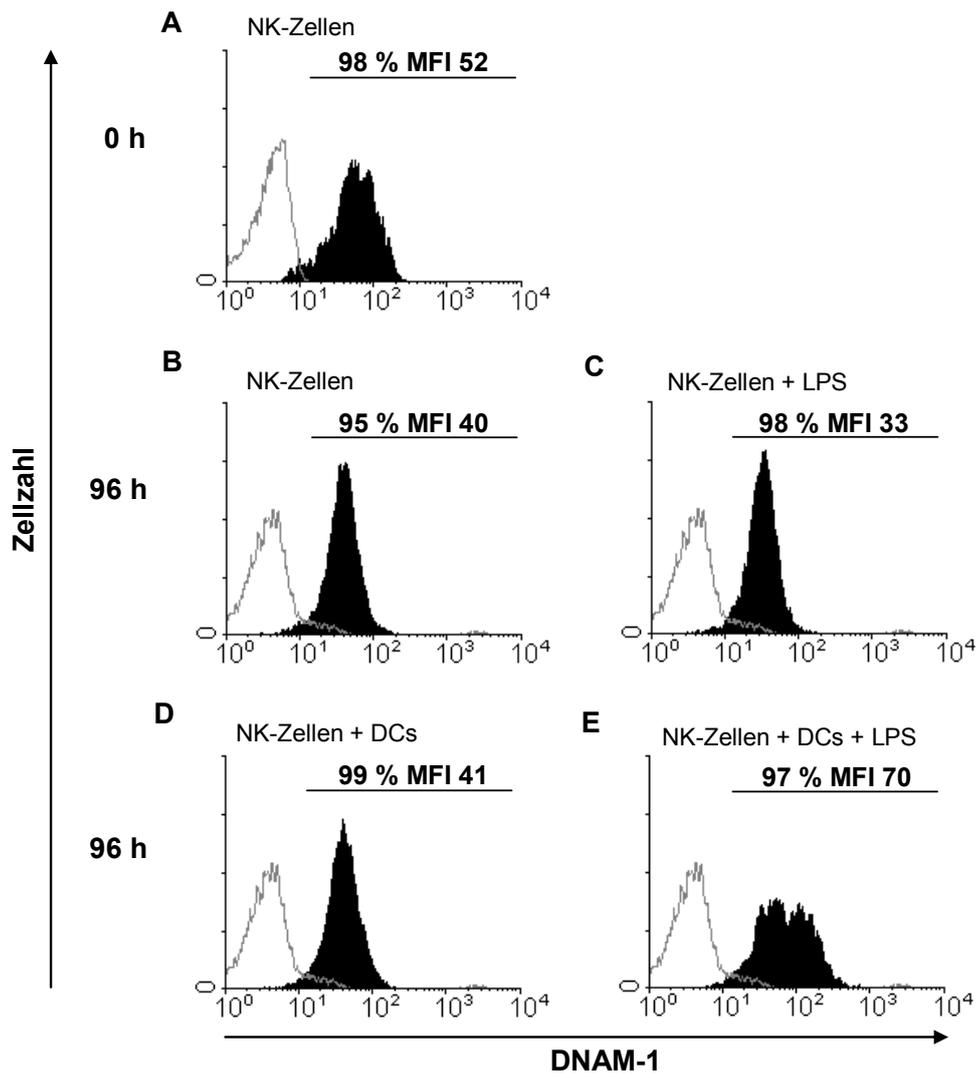


Abbildung 11: Einfluss von slanDCs auf die DNAM-1-Expression von NK-Zellen. NK-Zellen ($2,5 \times 10^5$) wurden in Abwesenheit (B, C) oder Gegenwart (D, E) von muren slanDCs (1×10^5) mit (C, E) oder ohne (B, D) LPS kultiviert. Nach 0 h (A) und 96 h (B-E) wurde die Expression von DNAM-1 auf der Oberfläche von NK-Zellen mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Isotypkontrolle (grauer Graph) und die mit anti-DNAM-1-Antikörpern gefärbten NK-Zellen (schwarzer Graph) sind dargestellt. Zusätzlich werden der MFI-Wert und die Prozentzahl DNAM-1-exprimierender NK-Zellen unter Berücksichtigung der Isotypkontrolle gezeigt. Es ist ein repräsentativer von vier untersuchten Spendern angegeben.

3.1.4 Wirkung von slanDCs auf die IFN- γ -Produktion von NK-Zellen

Die immunregulatorischen Fähigkeiten von NK-Zellen sind während der Ausbildung einer Immunantwort von großer Bedeutung. Aktivierte NK-Zellen produzieren immunmodulatorische Zytokine, wie IFN- γ . Es wirkt proliferationshemmend auf infizierte Zellen und Tumorzellen sowie aktivierend auf Immunzellen, wie Makrophagen, NK-Zellen und T-Zellen. Dabei unterstützt IFN- γ die zelluläre Immunantwort bei der Ausbildung einer Entzündungsreaktion (Schroder *et al.*, 2004; Schoenborn und Wilson, 2007). Deshalb wurde der Einfluss von slanDCs auf die IFN- γ -Produktion von NK-Zellen evaluiert. Dazu wurden slanDCs und NK-Zellen isoliert, in An- oder Abwesenheit von LPS kokultiviert und die IFN- γ -Konzentrationen mittels ELISA quantifiziert (Gliederungspunkt 2.2.8). Die Daten ergaben, dass ausschließlich LPS-stimulierte slanDCs in der Lage waren, eine signifikante Freisetzung von IFN- γ durch NK-Zellen zu induzieren (Abb. 12). Dagegen bewirkten unstimulierte slanDCs keine IFN- γ -Sekretion (<100 pg/ml) in NK-Zellen. Eine relevante IFN- γ -Produktion von slanDCs wurde mit Hilfe einer intrazytoplasmatischen Färbung und nachfolgender Analyse der Zellen im Durchflusszytometer ausgeschlossen.

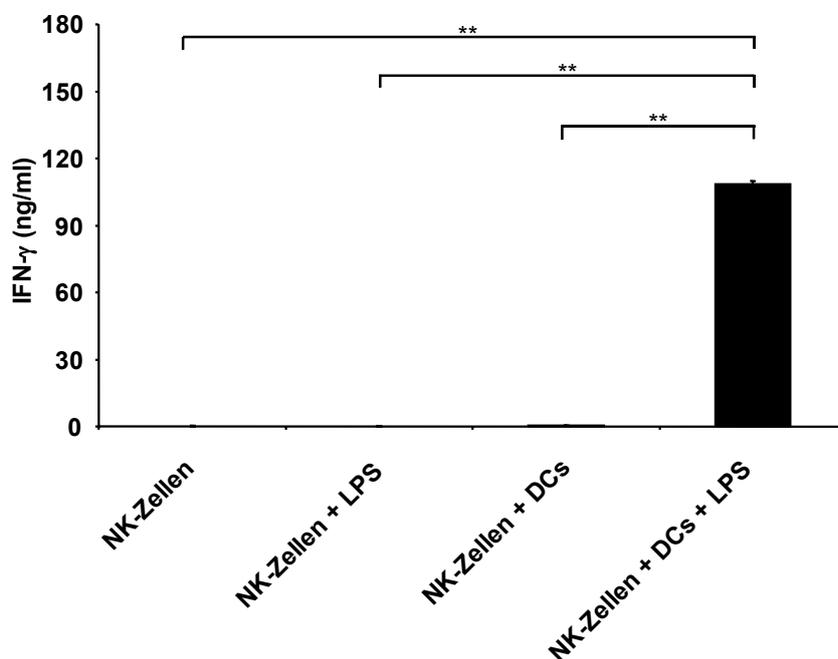


Abbildung 12: Beeinflussung der IFN- γ -Produktion von NK-Zellen durch slanDCs. NK-Zellen ($2,5 \times 10^5$) und ausgereifte slanDCs (1×10^5) wurden in An- oder Abwesenheit von LPS für 96 h inkubiert. Danach erfolgten die Ernte der Zellkulturüberstände und die Bestimmung der IFN- γ -Konzentrationen mittels ELISA. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Doppelbestimmung, die Standardabweichungen der Mittelwerte und die statistische Signifikanz (** $p \leq 0,01$). Von sechs untersuchten ist ein repräsentativer Spender dargestellt.

Ausgehend von den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die eine Korrelation zwischen IFN- γ und IL-12 zeigten (Young und Bream, 2007), sowie der Tatsache, dass LPS-aktivierte slanDCs IL-12 produzieren (Schäkel *et al.*, 2006), wurde die Bedeutung dieses Zytokins bei der IFN- γ -Produktion von NK-Zellen analysiert. Die Evaluation der IFN- γ -Sekretion in Kokulturen von NK-Zellen und LPS-stimulierten slanDCs erfolgte in An- oder Abwesenheit von neutralisierenden anti-IL-12-Antikörpern. Die Daten zeigten, dass die Blockade von IL-12 in den Kokulturen eine fast vollständige Reduktion der IFN- γ -Sekretion bewirkt (Abb. 13). Als Kontrollen dienten Kokulturen von LPS-aktivierten slanDCs und NK-Zellen in Abwesenheit von Antikörpern oder in Gegenwart von Isotyp-Kontroll-Antikörpern, wobei die IFN- γ -Produktion der NK-Zellen nicht beeinflusst wurde. Diese Ergebnisse demonstrierten, dass IL-12 der entscheidende Faktor für die slanDC-vermittelte IFN- γ -Sekretion von NK-Zellen ist.

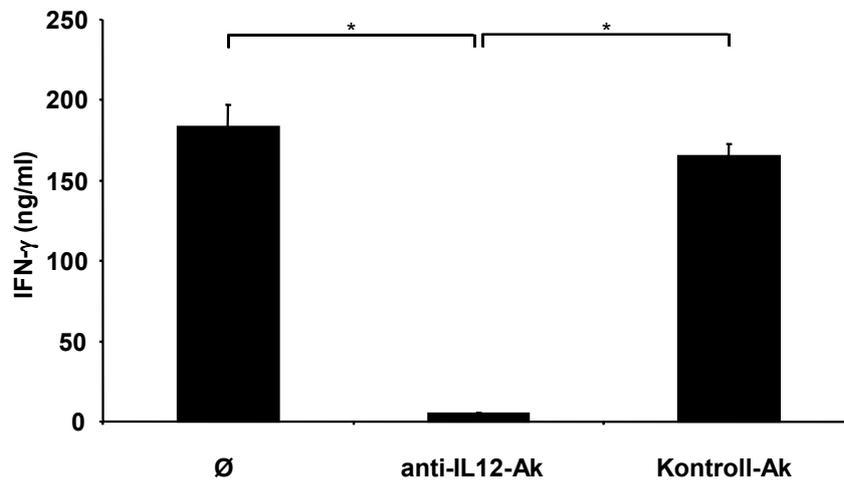


Abbildung 13: Bedeutung von IL-12 bei der slanDC-vermittelten Induktion der IFN- γ -Sekretion von NK-Zellen.

NK-Zellen ($2,5 \times 10^5$) und ausgereifte slanDCs (1×10^5) wurden in Anwesenheit von LPS sowie anti-IL-12-Antikörpern oder Isotyp-Kontroll-Antikörpern inkubiert. Nach 96 h erfolgten die Ernte der Zellkulturüberstände und die Bestimmung der IFN- γ -Konzentrationen mittels ELISA. Abgebildet sind die Mittelwerte einer Doppelbestimmung, die Standardabweichungen der Mittelwerte und die statistische Signifikanz (* $p \leq 0,05$). Von vier getesteten ist ein repräsentativer Spender abgebildet.

3.1.5 Modulation der Tumor-gerichteten Zytotoxizität von NK-Zellen durch slanDCs

NK-Zellen sind durch ihr ausgeprägtes zytotoxisches Potential wesentlich an der Elimination von Tumorzellen beteiligt. Daher wurde in weiteren Untersuchungen evaluiert, ob slanDCs die zytolytische Aktivität von NK-Zellen beeinflussen. Dazu erfolgte die Kokultur von slanDCs und NK-Zellen in An- oder Abwesenheit von LPS. Danach wurden die NK-Zellen mit einer Reinheit von >95 % von den adhärennten slanDCs getrennt und ihre Zytotoxizität gegenüber der Tumorzelllinie K562 in einem Chromfreisetzungstest analysiert (Gliederungspunkt 2.2.10). Die Ergebnisse zeigten, dass NK-Zellen ohne zusätzliche Stimuli in der Lage waren, K562-Zellen zu lysieren, die durch eine geringe Expression von MHC-Klasse I-Molekülen charakterisiert sind (Abb. 14). Die NK-Zell-vermittelte Lyse der K562-Zellen wurde durch LPS-aktivierte slanDCs signifikant verstärkt. Im Gegensatz dazu bewirkten unstimulierte slanDCs keine Erhöhung des zytotoxischen Potentials von NK-Zellen. Weitere Experimente demonstrierten, dass slanDCs unter den verwendeten Kulturbedingungen keine zytolytische Aktivität gegenüber Tumorzellen besitzen.

NK-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Elimination von Blasten bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (Ruggeri *et al.*, 2007 B). Deshalb wurde der Einfluss von slanDCs auf das zytotoxische Potential von NK-Zellen gegenüber diesen primären Tumorzellen analysiert. Es wurde ein Chromfreisetzungstest mit AML-Blasten als Zielzellen durchgeführt (Gliederungspunkt 2.2.10). Die Untersuchungen ergaben, dass unstimulierte NK-Zellen zu keiner Lyse von AML-Blasten in der Lage sind (Abb. 15). Dies weist im Vergleich zu K562-Zellen auf eine geringere Sensitivität der AML-Blasten gegenüber NK-Zellen hin. Im Gegensatz dazu induzierten LPS-aktivierte slanDCs ein deutliches zytotoxisches Potential von NK-Zellen gegenüber AML-Blasten. Diese Fähigkeit besaßen unstimulierte slanDCs nicht.

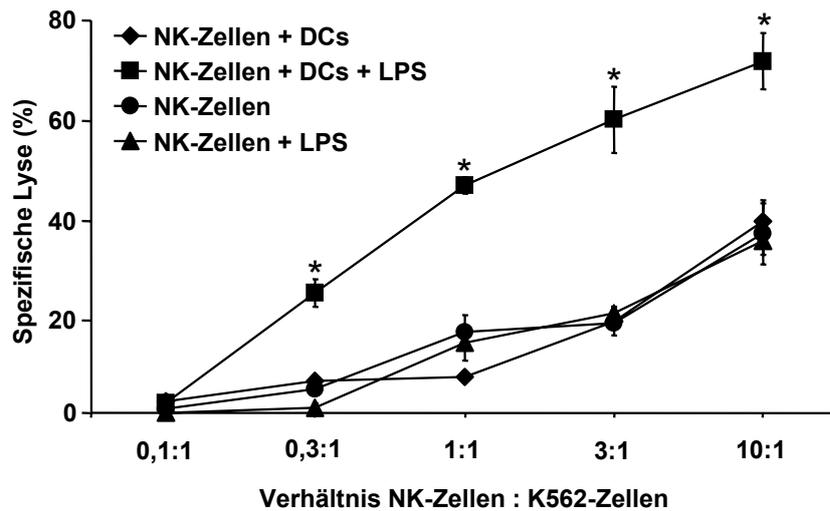


Abbildung 14: Einfluss von slanDCs auf die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gegenüber K562-Zellen.

NK-Zellen ($2,5 \times 10^5$) wurden in An- oder Abwesenheit von ausgereiften slanDCs (1×10^5) mit und ohne LPS für 96 h kokultiviert. Danach wurden die NK-Zellen geerntet und in verschiedenen NK-Zell : Tumorzell-Verhältnissen mit ^{51}Cr -beladenen K562-Zellen (5×10^3) inkubiert. Nach 4 h erfolgte die Bestimmung der Chromfreisetzung. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung und deren Standardabweichungen. Die statistische Signifikanz kennzeichnet den Unterschied in der spezifischen Lyse von K562-Zellen durch NK-Zellen nach Kokultur mit LPS-aktivierten slanDCs und nach Stimulation mit LPS (* $p \leq 0,05$). Von drei untersuchten ist ein repräsentativer Spender gezeigt.

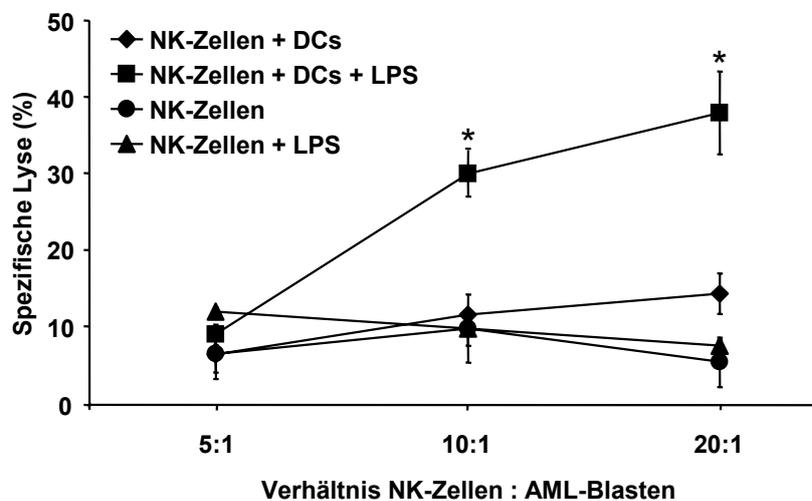


Abbildung 15: Wirkung von slanDCs auf die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gegenüber AML-Blasten.

NK-Zellen ($2,5 \times 10^5$) wurden allein oder mit muren slanDCs (1×10^5) in An- oder Abwesenheit von LPS für 96 h kultiviert, dann geerntet und mit ^{51}Cr -beladenen AML-Blasten (5×10^3) in verschiedenen NK-Zell : Tumorzell-Verhältnissen inkubiert. Die Ergebnisse des Chromfreisetzungstestes stellen Mittelwerte einer Dreifachbestimmung und die Standardabweichungen der Mittelwerte dar. Die statistische Signifikanz beschreibt den Unterschied in der spezifischen Lyse von K562-Zellen durch NK-Zellen nach Kokultur mit LPS-aktivierten slanDCs und nach Stimulation mit LPS (* $p \leq 0,05$). Von drei getesteten ist ein repräsentativer Spender abgebildet.

Ausgehend von der Beobachtung, dass IL-12 für die slanDC-vermittelte Verstärkung der IFN- γ -Sekretion von NK-Zellen verantwortlich ist (Gliederungspunkt 3.1.4), wurde der Einfluss von IL-12 auf die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen analysiert. Dafür erfolgte die Inkubation von NK-Zellen und LPS-stimulierten slanDCs in An- oder Abwesenheit von blockierenden anti-IL-12-Antikörpern. Danach wurden die NK-Zellen isoliert und in einem Chromfreisetzungstest mit K562-Zellen als Zielzellen untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Reduktion der Lyse von K562-Zellen durch NK-Zellen nach Neutralisation von IL-12 in den Kokulturen mit LPS-aktivierten slanDCs (Abb. 16). Dagegen wiesen NK-Zellen, die in Abwesenheit von Antikörpern oder in Gegenwart von Isotyp-Kontroll-Antikörpern mit LPS-stimulierten slanDCs inkubiert wurden, keine Reduktion der zytotoxischen Aktivität gegenüber den Tumorzellen auf. Diese Beobachtungen zeigten, dass IL-12 auch bei der slanDC-vermittelten Erhöhung des zytotoxischen Potentials von NK-Zellen von großer Bedeutung ist.

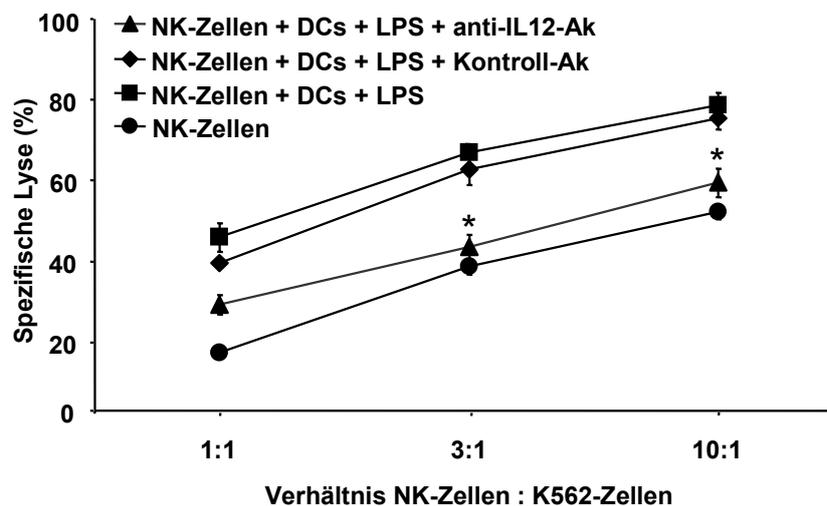


Abbildung 16: Bedeutung von IL-12 bei der slanDC-vermittelten Steigerung der Lyse von K562-Zellen durch NK-Zellen.

NK-Zellen ($2,5 \times 10^5$) wurden mit ausgereiften slanDCs (1×10^5), LPS sowie anti-IL-12-Antikörpern oder Isotyp-Kontroll-Antikörpern für 96 h kultiviert und danach geerntet. Ein Chromfreisetzungstest mit K562-Zellen (5×10^3) und NK-Zellen in verschiedenen Verhältnissen schloss sich an. Die Resultate stellen die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung dar und zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte. Die statistische Signifikanz charakterisiert den Unterschied in der spezifischen Lyse von K562-Zellen durch NK-Zellen nach Kokultur mit LPS-aktivierten slanDCs und nach Stimulation mit LPS (* $p \leq 0,05$). Von drei untersuchten ist ein repräsentativer Spender angegeben.

Die durchgeführten Experimente ergaben, dass LPS-stimulierte slanDCs effektive Aktivatoren von NK-Zellen sind. Dies wurde insbesondere durch die Induktion der Proliferation und die verstärkte Expression von aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren sowie Korezeptoren deutlich. Außerdem wurde gezeigt, dass die Sekretion von IL-12 durch slanDCs eine IFN- γ -Produktion in NK-Zellen induziert und zu einer Verstärkung des antitumoralen lytischen Potentials von NK-Zellen führt.

3.2 Charakterisierung der Wirkung von NK-Zellen auf slanDCs

3.2.1 Einfluss von NK-Zellen auf die Vitalität von slanDCs

In den letzten Jahren zeigte sich, dass NK-Zellen zu einer Lyse unreifer MoDCs befähigt sind, dies soll zur Beendigung einer Immunreaktion beitragen (Ferlazzo *et al.*, 2002; Pende *et al.*, 2006). Deshalb wurde das zytotoxische Potential von NK-Zellen gegenüber slanDCs analysiert. SlanDCs und NK-Zellen wurden isoliert und sofort ohne zusätzliche exogene Stimuli kokultiviert. Die Analyse der Vitalität von slanDCs erfolgte innerhalb von 12 h in dreistündigen Intervallen durch die Messung des DNA-interkalierenden Farbstoffs 7-AAD im Durchflusszytometer (Gliederungspunkt 2.2.7). Die Daten demonstrierten, dass NK-Zellen zu keinem Zeitpunkt eine zusätzliche Steigerung des Prozentsatzes 7-AAD-gefärbter slanDCs bewirken und somit die Vitalität von slanDCs nicht beeinflussen (Abb. 17).

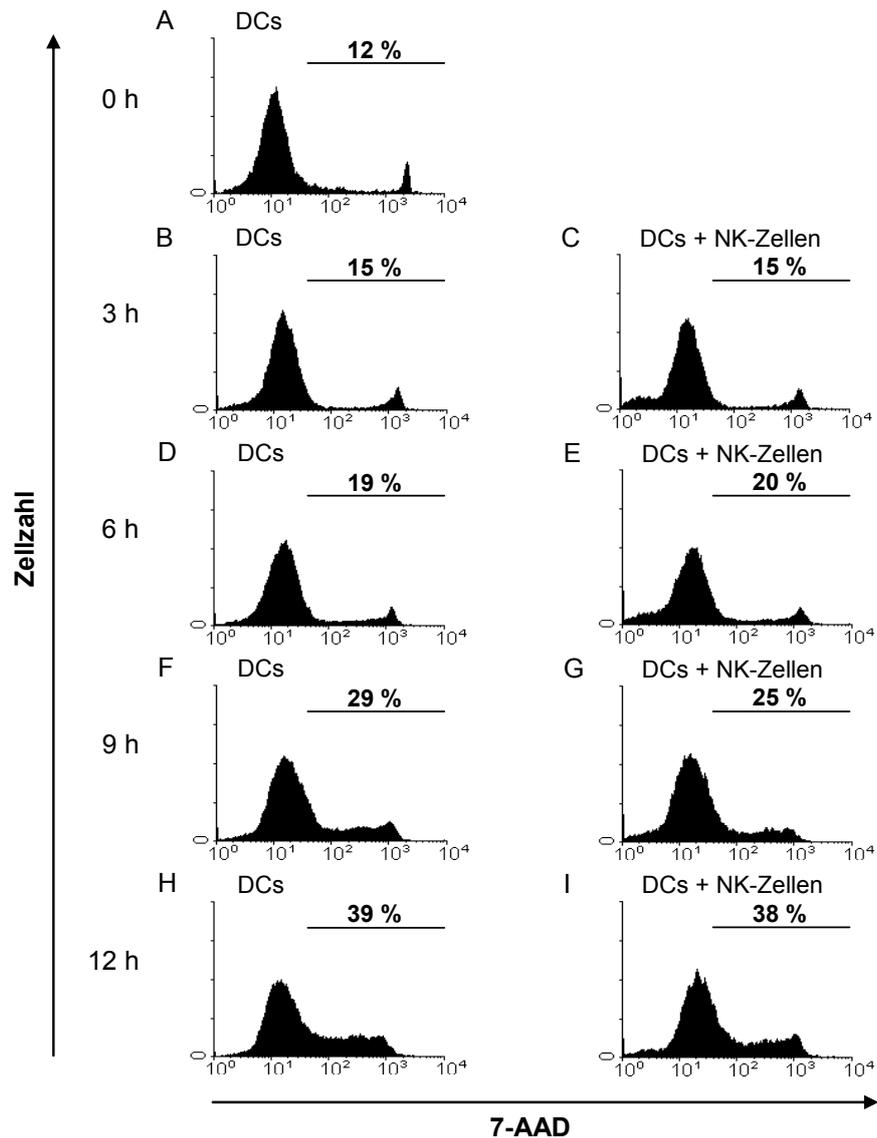


Abbildung 17: Vitalitätsmessung von slanDCs nach Kontakt mit NK-Zellen.

Frisch isolierte slanDCs (1×10^5) wurden mit (C, E, G, I) oder ohne (B, D, F, H) NK-Zellen (4×10^5) kultiviert. Nach 0, 3, 6, 9 und 12 h erfolgten die Färbung von slanDCs mit dem Farbstoff 7-AAD und die Analyse der Zellen im Durchflusszytometer. Es sind die gefärbten slanDCs eines repräsentativen von vier getesteten Spendern dargestellt. Zusätzlich ist der prozentuale Anteil von slanDCs angegeben, die sich von den lebenden Zellen (linker Peak) durch eine Färbung mit 7-AAD abgrenzen.

3.2.2 Beeinflussung der Maturierung von slanDCs durch NK-Zellen

Die Ausreifung von DCs ist für ihre Fähigkeit zur Aktivierung von CD8⁺ T-Lymphozyten sowie zur Induktion, Expansion und Differenzierung von CD4⁺ T-Helferzellen von hoher Relevanz. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von NK-Zellen auf die Maturierung von slanDCs evaluiert. Die Ausreifung von slanDCs kennzeichnet eine verstärkte Expression von MHC-Klasse II-Molekülen, wie HLA-DR, von kostimulatorischen Molekülen, wie CD86, und von Adhäsionsmolekülen, wie ICAM-1. Außerdem werden mature slanDCs durch die Expression von CD83 charakterisiert. Zur Analyse dieser Moleküle wurden slanDCs und NK-Zellen isoliert und sofort kokultiviert. Danach erfolgte die Bestimmung von HLA-DR, CD86, ICAM-1 und CD83 auf der Oberfläche von slanDCs im Durchflusszytometer (Gliederungspunkt 2.2.7). Die alleinige Kultivierung von slanDCs bewirkte eine erhöhte Expression der untersuchten Moleküle, dies charakterisiert die spontane Maturierung von slanDCs *in vitro* (Abb. 18-21, B). Außerdem zeigten die Resultate, dass NK-Zellen zu einem deutlichen Anstieg der Expressionsdichte von HLA-DR, CD86 und ICAM-1 auf der Oberfläche von slanDCs führen (Abb. 18-20, C). Darüber hinaus wurden der prozentuale Anteil der CD83-exprimierenden slanDCs und die Expressionsdichte von CD83 erhöht (Abb. 21, C). Die Ergebnisse demonstrierten, dass NK-Zellen effizient in der Lage sind, die Maturierung von slanDCs zu fördern.

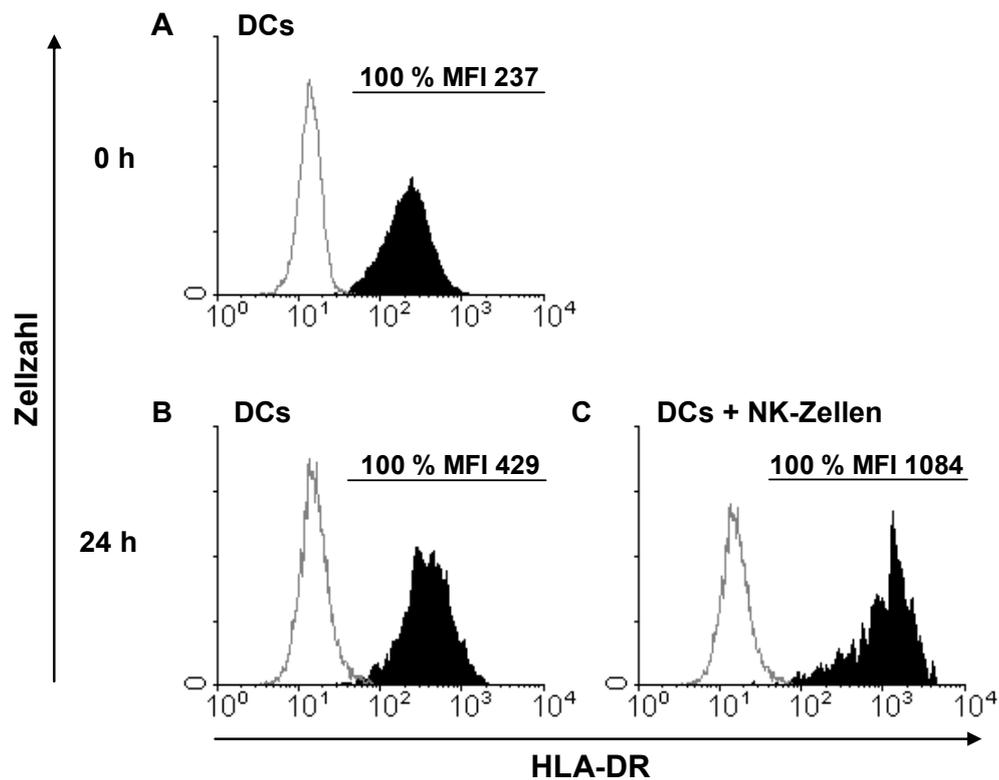


Abbildung 18: Einfluss von NK-Zellen auf die HLA-DR-Expression von slanDCs. SlanDCs (1×10^5) wurden ohne (B) oder mit (C) NK-Zellen ($2,5 \times 10^5$) inkubiert. Die Analyse der slanDCs erfolgte nach 0 h (A) und 24 h (B, C) im Durchflusszytometer. Die Isotypkontrolle (grauer Graph) und die mit anti-HLA-DR-Antikörpern gefärbten slanDCs (schwarzer Graph) sind dargestellt. Außerdem werden der MFI-Wert und die Prozentzahl der HLA-DR-exprimierenden slanDCs unter Berücksichtigung der Isotypkontrolle gezeigt. Von fünf getesteten ist ein repräsentativer Spender angegeben.

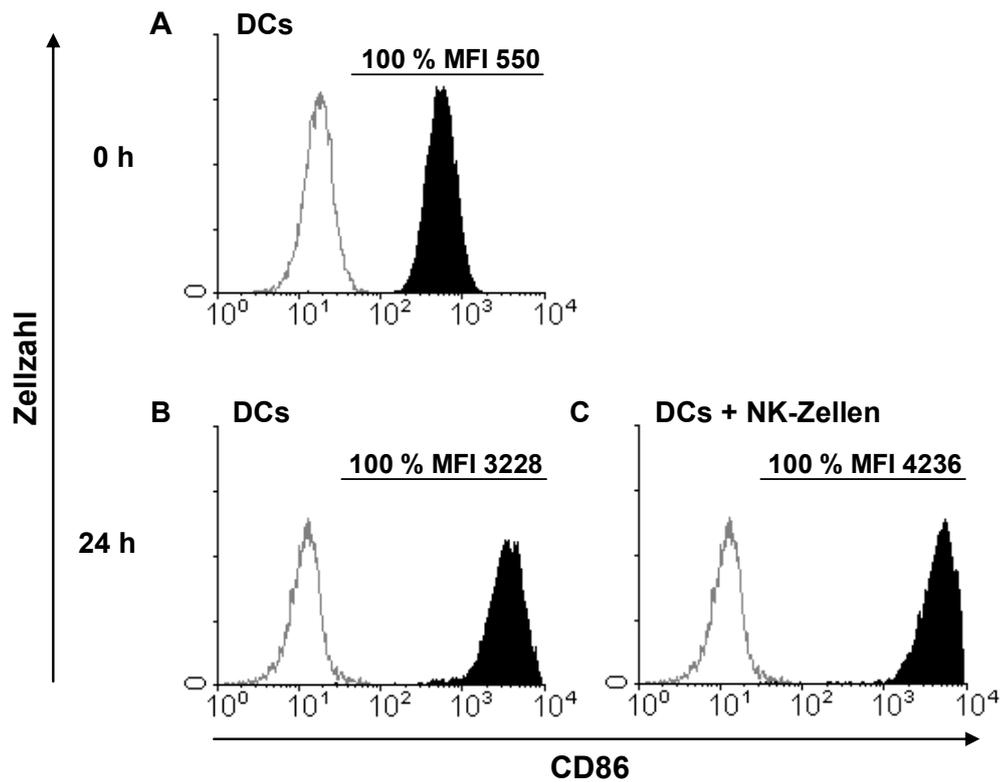


Abbildung 19: Bedeutung von NK-Zellen bei der Expression von CD86 auf slanDCs. Frisch isolierte slanDCs (1×10^5) wurden ohne (B) oder mit (C) NK-Zellen ($2,5 \times 10^5$) kultiviert. Nach 0 h (A) und 24 h (B, C) erfolgten die Färbung und die Analyse der slanDCs im Durchflusszytometer. Die Isotypkontrolle (grauer Graph) und die mit anti-CD86-Antikörpern gefärbten slanDCs (schwarzer Graph) sind abgebildet. Außerdem werden der MFI-Wert und die Prozentzahl der CD86-exprimierenden slanDCs unter Berücksichtigung der Isotypkontrolle gezeigt. Von fünf untersuchten ist ein repräsentativer Spender dargestellt.

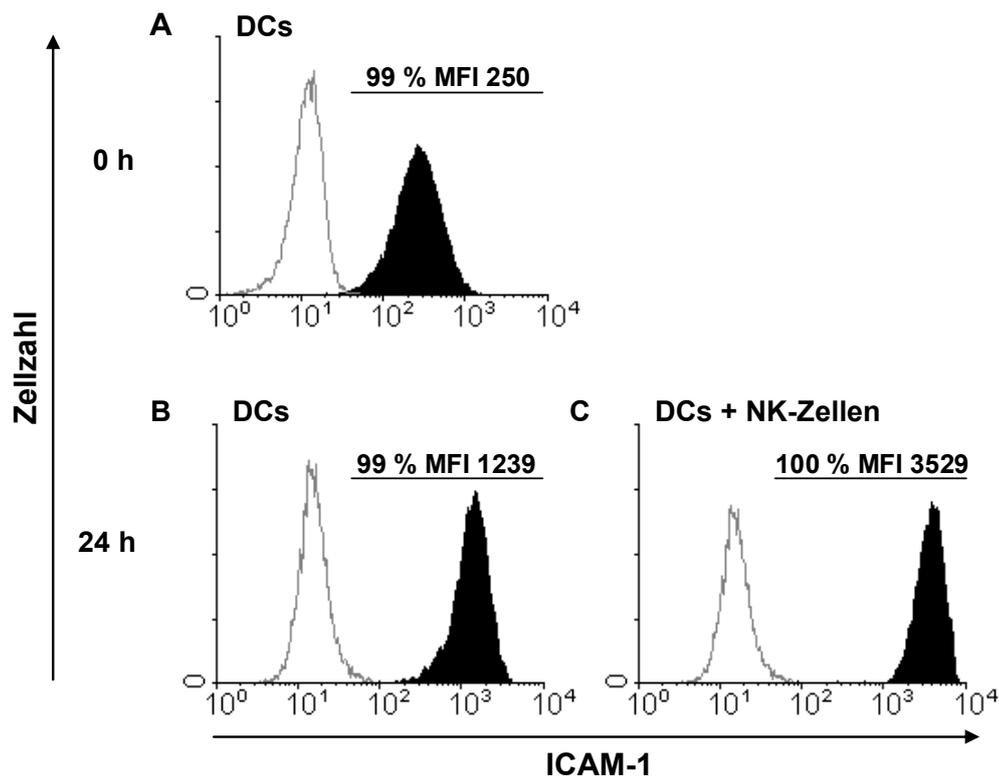


Abbildung 20: Wirkung von NK-Zellen auf die ICAM-1-Expression von slanDCs. Frisch isolierte slanDCs (1×10^5) wurden in Ab- (B) oder Anwesenheit (C) von NK-Zellen ($2,5 \times 10^5$) kultiviert. Nach 0 h (A) und 24 h (B, C) wurde die Expression von ICAM-1 auf der Oberfläche von slanDCs bestimmt. Gezeigt werden die Isotypkontrolle (grauer Graph) und die mit anti-ICAM-1-Antikörpern gefärbten slanDCs (schwarzer Graph). Außerdem sind der MFI-Wert und die Prozentzahl der ICAM-1-exprimierenden slanDCs unter Berücksichtigung der Isotypkontrolle dargestellt. Von fünf getesteten ist ein repräsentativer Spender angegeben.

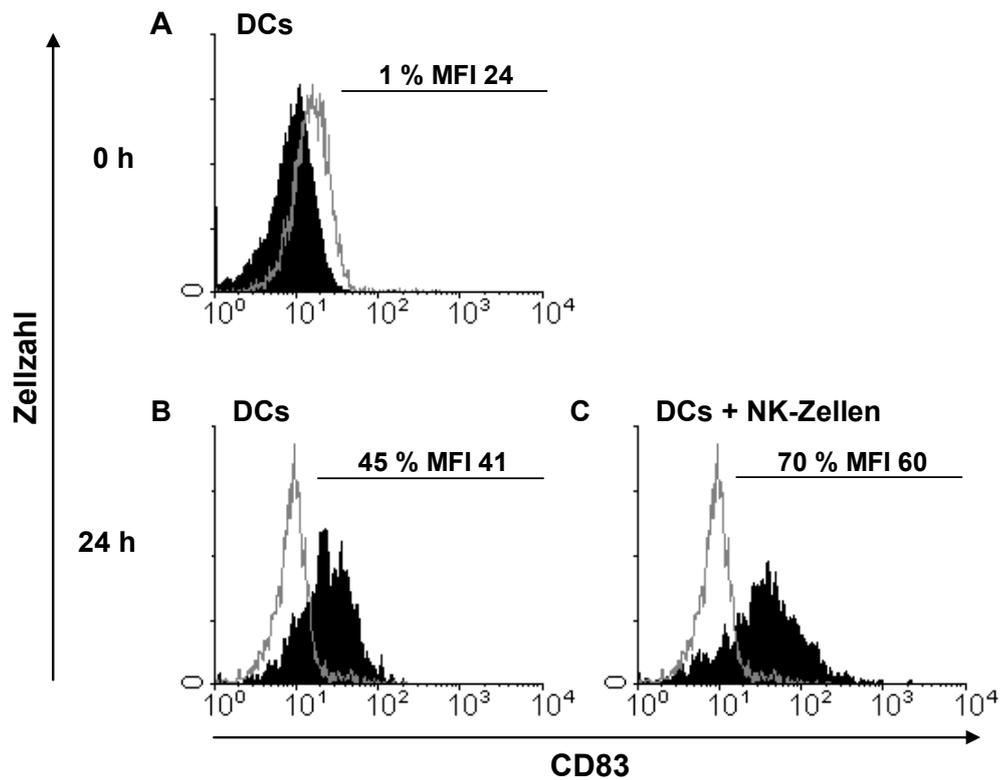


Abbildung 21: Beeinflussung der CD83-Expression von slanDCs durch NK-Zellen. SlanDCs (1×10^5) wurden in Ab- (B) oder Anwesenheit (C) von NK-Zellen ($2,5 \times 10^5$) inkubiert. Nach 0 h (A) und 24 h (B, C) wurde die Expression von CD83 durch Färbung der Zellen mit anti-CD83-Antikörpern im Durchflusszytometer gemessen. Abgebildet sind die Isotypkontrolle (grauer Graph) und die gefärbten slanDCs (schwarzer Graph). Außerdem werden der MFI-Wert und die Prozentzahl der CD83-exprimierenden slanDCs unter Berücksichtigung der Isotypkontrolle gezeigt. Ein repräsentativer von fünf untersuchten Spendern ist dargestellt.

3.2.3 Modulation der Zytokinsekretion von slanDCs durch NK-Zellen

Vor kurzem wurde gezeigt, dass LPS-stimulierte slanDCs wesentliche Produzenten des immunmodulatorischen Zytokins IL-12 sind (Schäkel *et al.*, 2006). Dieses proinflammatorische Molekül steuert die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Lymphozyten in Th1-Zellen. Darüber hinaus belegen die Experimente dieser Arbeit, dass IL-12 die IFN- γ -Produktion und das zytotoxische Potential von NK-Zellen stimuliert (Gliederungspunkte 3.1.4 und 3.1.5). Für die Evaluation des Einflusses von NK-Zellen auf die IL-12-Produktion von slanDCs wurden die beiden Zell-Populationen isoliert und sofort kokultiviert. Die Aktivierung der muren slanDCs erfolgte durch Zugabe von LPS. Die Zytokinkonzentrationen der Zellkulturüberstände wurden mittels ELISA quantifiziert (Gliederungspunkt 2.2.8). Die Ergebnisse dokumentierten, eine signifikante Steigerung der IL-12-Produktion LPS-aktivierter slanDCs durch NK-Zellen (Abb. 22). Dagegen induzierten NK-Zellen keine Sekretion von IL-12 in unstimulierten slanDCs. In weiteren Versuchen wurde mittels intrazytoplasmatischer Färbung und Analyse der Zellen im Durchflusszytometer gezeigt, dass NK-Zellen kein IL-12 produzieren.

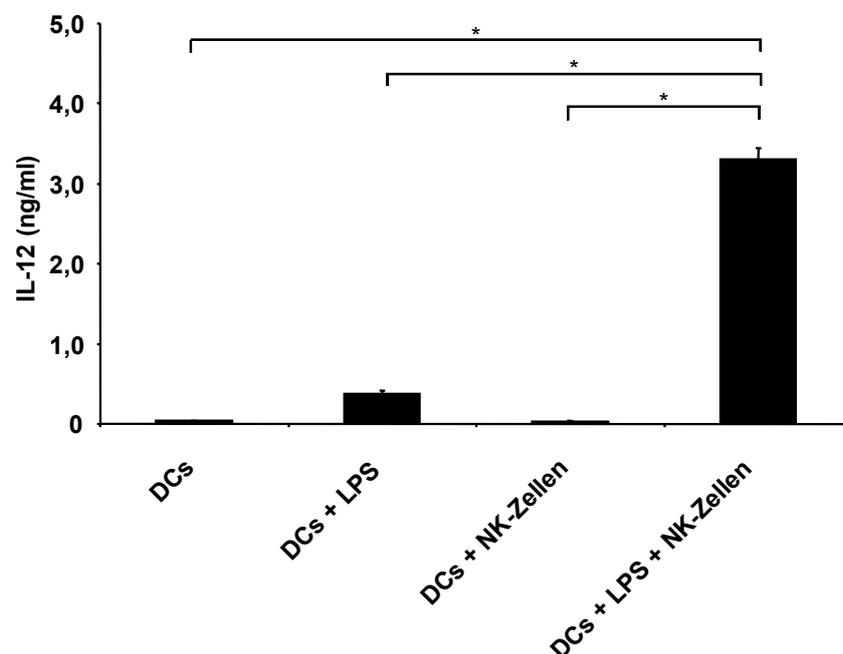


Abbildung 22: Bedeutung von NK-Zellen bei der IL-12-Sekretion von slanDCs. SlanDCs (1×10^5) wurden allein oder mit NK-Zellen ($2,5 \times 10^5$) kokultiviert. Nach 6 h erfolgte die Zugabe von LPS. Die Zellkulturüberstände wurden nach 24 h gewonnen und die IL-12-Konzentrationen mittels ELISA bestimmt. Es sind die Mittelwerte einer Doppelbestimmung, deren Standardabweichungen und die statistische Signifikanz der Daten angegeben (* $p \leq 0,05$). Die Resultate eines repräsentativen von sechs untersuchten Spendern werden gezeigt.

Weitere Analysen des Zytokinprofils von slanDCs ergaben, dass LPS-aktivierte slanDCs das immunsuppressive Zytokin IL-10 produzieren. IL-10 zeichnet sich durch seine inhibierende Wirkung auf CD4⁺ T-Lymphozyten und CD8⁺ CTLs sowie die Stimulation von regulatorischen T-Zellen aus (Conti *et al.*, 2003; Howell *et al.*, 2006). Die Ergebnisse dokumentierten eine signifikante IL-10-Sekretion von LPS-aktivierten slanDCs (Abb. 23). Außerdem wurde der Einfluss von NK-Zellen auf die IL-10-Freisetzung von slanDCs evaluiert. Dabei zeigte sich, dass NK-Zellen die IL-10-Sekretion LPS-stimulierter slanDCs signifikant reduzieren. Durchflusszytometrische Analysen intrazytoplasmatischer Färbungen ergaben, dass NK-Zellen unter den verwendeten Kulturbedingungen nicht in der Lage sind, IL-10 zu produzieren. Somit verstärkten NK-Zellen die proinflammatorischen Fähigkeiten aktivierter slanDCs durch Steigerung der IL-12- und Reduktion der IL-10-Produktion.

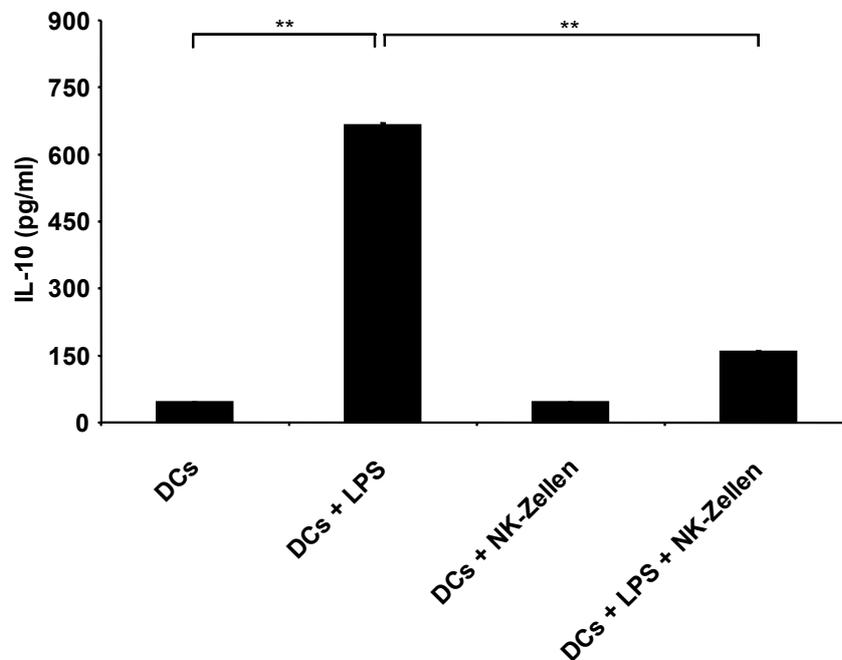


Abbildung 23: Wirkung von NK-Zellen auf die IL-10-Sekretion von slanDCs. SlanDCs (1×10^5) wurden mit oder ohne NK-Zellen ($2,5 \times 10^5$) inkubiert und nach 6 h mit LPS aktiviert. Nach 48 h wurden die Zellkulturüberstände geerntet und die IL-10-Konzentrationen mittels ELISA gemessen. Die Mittelwerte einer Doppelbestimmung, die Standardabweichungen der Mittelwerte und die statistische Signifikanz sind angegeben (** $p \leq 0,01$). Von sechs untersuchten ist ein repräsentativer Spender dargestellt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass NK-Zellen nach Kokultur mit LPS-stimulierten slanDCs IFN- γ produzieren (Gliederungspunkt 3.1.4). Da Studien anderer Arbeitsgruppen eine Abhängigkeit der IL-12-Produktion durch MoDCs von rekombinantem IFN- γ demonstrierten (Saito *et al.*, 2006; Frasca *et al.*, 2008), wurde der Einfluss des immunmodulatorischen Zytokins auf die Freisetzung von IL-12 und IL-10 durch slanDCs untersucht. NK-Zellen und slanDCs wurden isoliert und mit LPS in An- oder Abwesenheit von neutralisierenden anti-IFN- γ -Antikörpern kokultiviert. Danach erfolgte die Quantifizierung der Zytokine mittels ELISA (Gliederungspunkt 2.2.8). Die Blockade von IFN- γ führte zu einer signifikanten Reduktion der gesteigerten IL-12-Freisetzung in den Kokulturen von LPS-aktivierten slanDCs und NK-Zellen (Abb. 24). Dagegen wurde die IL-10-Sekretion von slanDCs nach der Neutralisation von IFN- γ erhöht (Abb. 25).

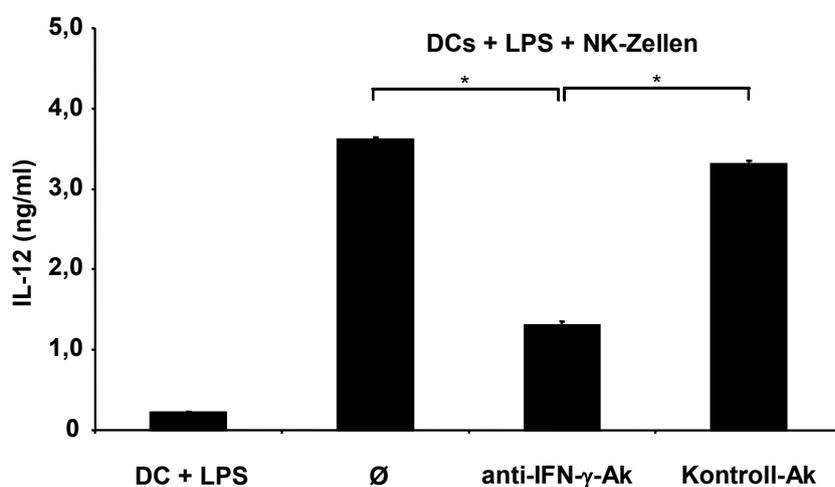


Abbildung 24: Einfluss von IFN- γ auf die NK-Zell-vermittelte Steigerung der IL-12-Produktion von slanDCs.

SlanDCs (1×10^5) wurden mit oder ohne NK-Zellen (1×10^5) in An- oder Abwesenheit von anti-IFN- γ -Antikörpern sowie Isotyp-Kontroll-Antikörpern kultiviert. Nach 6 h erfolgte die Zugabe von LPS und nach 24 h die Ernte der Zellkulturüberstände. Die IL-12-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. Es sind die Mittelwerte einer Doppelbestimmung, die Standardabweichungen der Mittelwerte und die statistische Signifikanz angegeben (* $p \leq 0,05$). Von drei untersuchten ist ein repräsentativer Spender dargestellt.

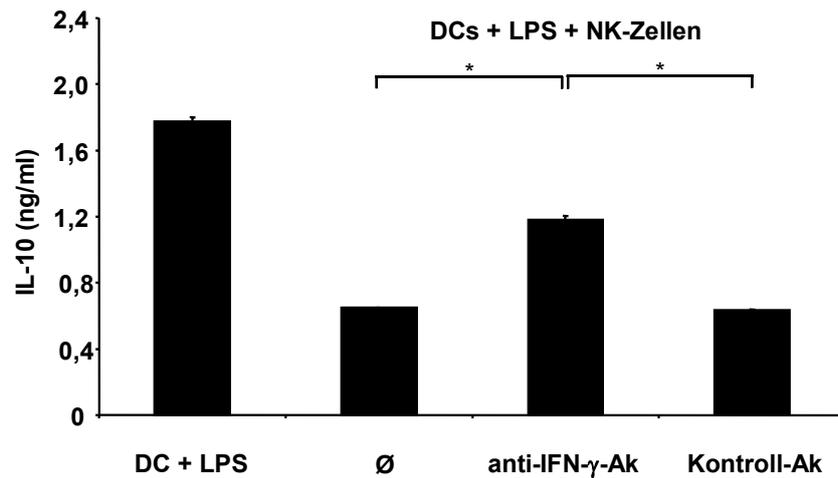


Abbildung 25: Wirkung von IFN- γ auf die NK-Zell-vermittelte Reduktion der IL-10-Freisetzung von slanDCs.

Die Inkubation von slanDCs (1×10^5) und NK-Zellen (1×10^5) fand in Anwesenheit von anti-IFN- γ -Antikörpern oder Isotyp-Kontroll-Antikörpern statt. Nach 6 h wurde LPS zu den Ansätzen gegeben und nach insgesamt 48 h erfolgte die Analyse der Zellkulturüberstände mittels IL-10-ELISA. Die Mittelwerte einer Doppelbestimmung, die Standardabweichungen der Mittelwerte und die statistische Signifikanz sind dargestellt (* $p \leq 0,05$). Von drei untersuchten ist ein repräsentativer Spender angegeben.

3.2.4 Modifikation der slanDC-vermittelten Programmierung von CD4⁺ T-Lymphozyten durch Interaktionen mit NK-Zellen

DCs induzieren effizient die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Lymphozyten in funktionell verschiedene Populationen. Die unterschiedlichen T-Zell-Populationen grenzen sich durch die Sekretion charakteristischer Zytokine voneinander ab. DC-produziertes IL-12 induziert beispielsweise die Entwicklung von Th1-Zellen, die IFN- γ sekretieren und eine Entzündungsreaktion auslösen. Andererseits können DCs zur Entstehung von Th2-Lymphozyten führen, die hauptsächlich IL-4 freisetzen und die Ausbildung einer humoralen Immunantwort fördern (Reiner, 2007). SlanDCs sind nach Stimulation mit LPS in der Lage, naive CD4⁺ T-Lymphozyten in Th1-Zellen zu differenzieren (Schäkel *et al.*, 2006; Wehner *et al.*, 2006). Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurde der Einfluss von NK-Zellen auf die slanDC-vermittelte Programmierung von naiven CD4⁺ T-Zellen analysiert. Dazu wurden slanDCs, NK-Zellen und naive CD4⁺ T-Lymphozyten isoliert (Gliederungspunkte 2.2.2 und 2.2.3). Zuerst wurden slanDCs und naive CD4⁺ T-Lymphozyten in die Vertiefungen einer Zellkulturplatte gegeben. Die Trennung zwischen den Kokulturen von slanDCs und T-Zellen einerseits sowie NK-Zellen und slanDCs andererseits erfolgte durch eine Membran, die zwar Zell-Zell-Kontakte verhinderte, den Austausch von löslichen Molekülen aber erlaubte. Auf dieser Membran wurden NK-Zellen in An- oder Abwesenheit von slanDCs inkubiert. Alle Kokulturen wurden nach 6 h mit LPS

stimuliert und eine Gesamtinkubationszeit von 8 Tagen schloss sich an (Gliederungspunkt 2.2.11). Danach wurden die CD4⁺ T-Zellen von den NK-Zellen durch das Entfernen der Membran getrennt und für weitere 24 h kultiviert. Während dieses Zeitraumes erfolgte eine Stimulation der CD4⁺ T-Lymphozyten mit PMA und Ionomycin. Die Zytokinproduktion der CD4⁺ T-Zellen wurde mittels ELISA bestimmt (Gliederungspunkt 2.2.8). Die Ergebnisse zeigten, dass LPS-aktivierte slanDCs eine Differenzierung naiver CD4⁺ T-Lymphozyten in IFN- γ -produzierende Th1-Zellen bewirken, während die alleinige Kultur von CD4⁺ T-Lymphozyten zu keiner wesentlichen IFN- γ -Sekretion (<200 pg/ml) führt (Abb. 26, A). Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Interaktionen von LPS-stimulierten slanDCs und NK-Zellen die Programmierung von IFN- γ -produzierenden Th1-Zellen deutlich steigern. NK-Zellen, die keinen direkten Zell-Zell-Kontakt mit slanDCs hatten, waren dagegen zu keiner signifikanten Erhöhung der IFN- γ -Sekretion von CD4⁺ T-Lymphozyten in der Lage. Die Analyse der IL-4-Sekretion von CD4⁺ T-Lymphozyten ergab, dass aktivierte slanDCs weder in An- noch in Abwesenheit von NK-Zellen eine Entwicklung IL-4-produzierender Th2-Zellen fördern (Abb. 26, B). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Interaktionen von NK-Zellen und slanDCs zu einer Verstärkung der Programmierung von naiven CD4⁺ T-Lymphozyten in proinflammatorische Th1-Zellen führen.

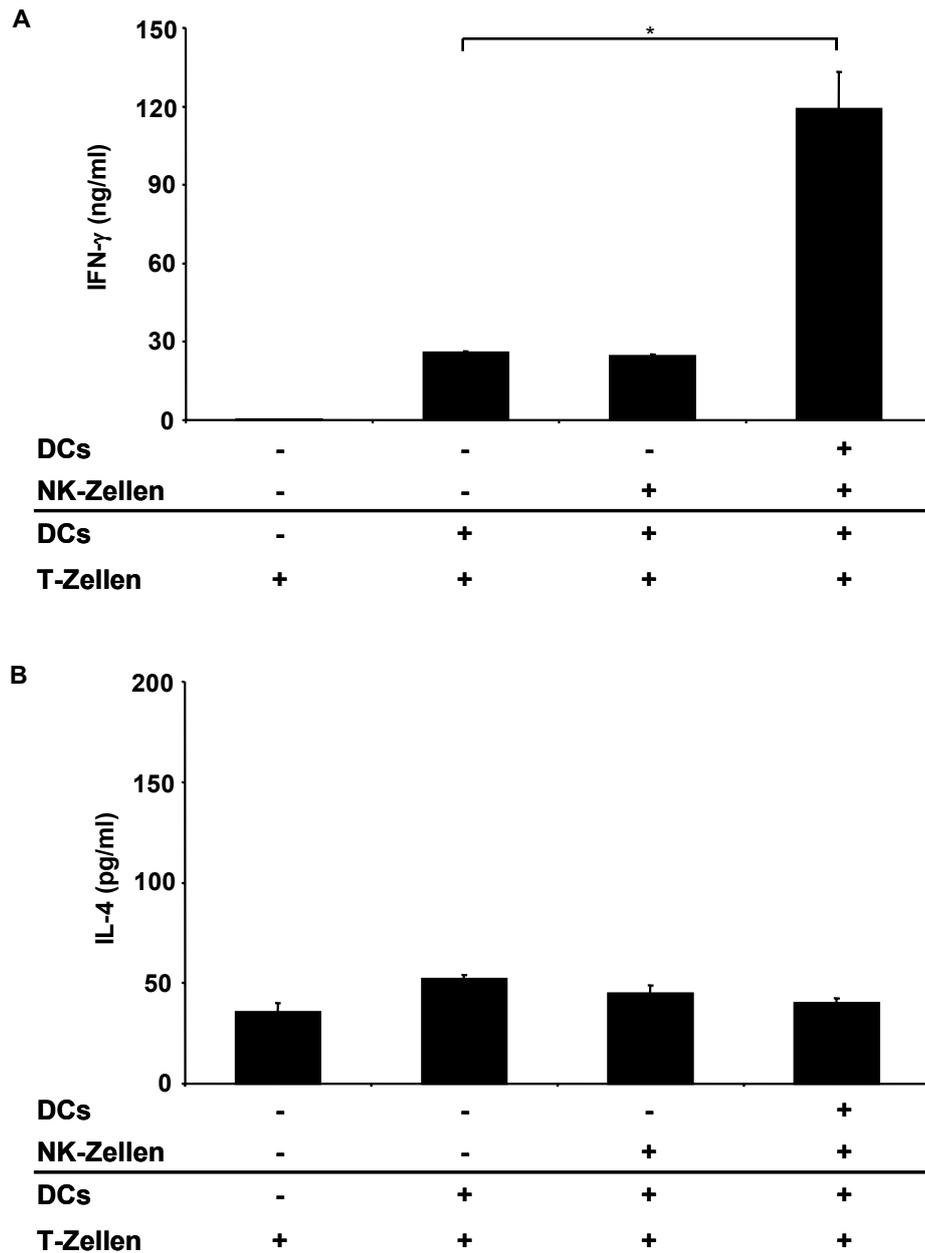


Abbildung 26: Einfluss von NK-Zellen auf die slanDC-vermittelte Programmierung von naiven $CD4^+$ T-Lymphozyten.

Während der Kokultur wurden NK-Zellen ($2,5 \times 10^5$) und naive $CD4^+$ T-Zellen (1×10^6) durch eine Membran getrennt, mit oder ohne slanDCs (1×10^5) inkubiert und mittels LPS stimuliert. Nach 8 Tagen wurden die Zellen geerntet und die $CD4^+$ T-Lymphozyten (2×10^5 Zellen) in Anwesenheit von PMA und Ionomycin kultiviert. Nach 24 h erfolgten die Ernte der Zellkulturüberstände und die Bestimmung der Konzentrationen von $IFN-\gamma$ (A) und IL-4 (B) mittels ELISA. Die Daten zeigen die Mittelwerte einer Doppelbestimmung, die Standardabweichungen der Mittelwerte und die statistische Signifikanz (* $p \leq 0,05$). Von vier untersuchten ist ein repräsentativer Spender dargestellt.

Die in diesem Abschnitt dargestellten Daten demonstrieren, dass NK-Zellen effektiv in der Lage sind, slanDCs zu stimulieren. Dabei wurden sowohl die Fähigkeiten von slanDCs zur Aktivierung von T-Lymphozyten als auch ihre proinflammatorische Wirkung gesteigert, indem eine Verstärkung der Ausreifung, eine Erhöhung der IL-12- und eine Reduktion der IL-10-Produktion erfolgte. Funktionelle Analysen zeigten, dass die Interaktionen von NK-Zellen und slanDCs die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Lymphozyten in IFN- γ -produzierende Th1-Zellen deutlich erhöhen.

3.3 Evaluation der Interaktionen von slanDCs und NKT-Zellen

3.3.1 Wirkung von slanDCs auf die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf NKT-Zellen

SlanDCs wurden als effektive Stimulatoren von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten beschrieben (Schäkel *et al.*, 1998; Schäkel *et al.*, 2002). Darüber hinaus zeigten die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse, dass slanDCs auch effiziente NK-Zell-Aktivatoren sind. In weiteren Untersuchungen wurden nun erstmals die Interaktionen zwischen nativen slanDCs und NKT-Zellen evaluiert, welche eine bedeutende Rolle bei der Immunabwehr von Tumoren spielen. Dabei kennzeichnet NKT-Zellen ihr zytotoxisches Potential und die Fähigkeit zur frühen Produktion von immunmodulatorischen Zytokinen. In ersten Analysen wurde der Einfluss von slanDCs auf die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf NKT-Zellen bestimmt. Dafür wurden die beiden Zell-Populationen isoliert (Gliederungspunkte 2.2.2 und 2.2.4) und NKT-Zellen mit ausgereiften slanDCs in An- oder Abwesenheit von LPS kokultiviert. Danach erfolgten die Ernte der Zellen und die Detektion von CD69 auf der Oberfläche von NKT-Zellen mittels Durchflusszytometrie (Gliederungspunkt 2.2.7). Die Ergebnisse zeigten eine markante Steigerung der Expressionsdichte von CD69 auf NKT-Zellen, die mit LPS-stimulierten slanDCs inkubiert wurden (Abb. 27, E). Im Gegensatz dazu waren unstimulierte slanDCs nicht in der Lage, die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf NKT-Zellen zu verändern (Abb. 27, D).

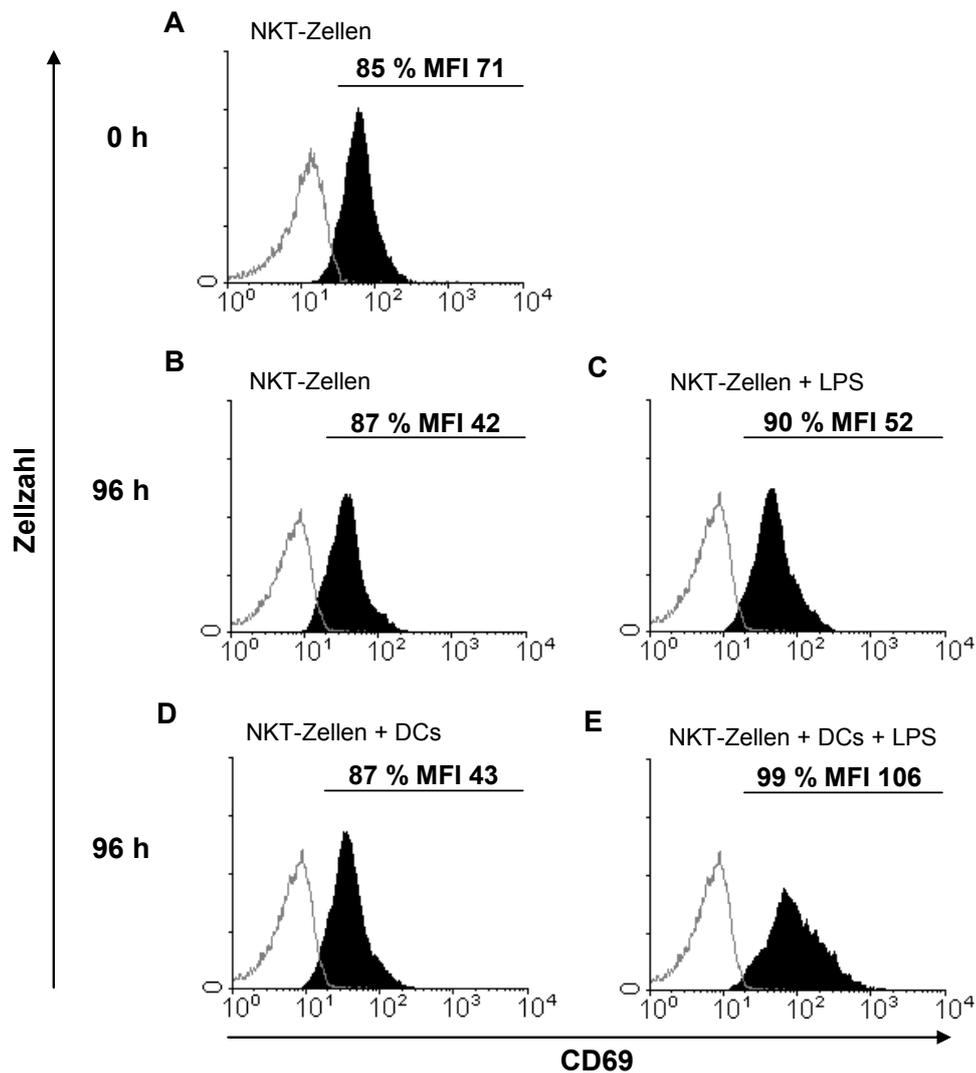


Abbildung 27: Einfluss von slanDCs auf die Expression von CD69 auf NKT-Zellen. NKT-Zellen ($2,5 \times 10^5$) wurden ohne (B, C) oder mit (D, E) muren slanDCs (1×10^5) in An- (C, E) oder Abwesenheit (B, D) von LPS kultiviert. Die Analyse der Zellen erfolgte nach 0 h (A) und 24 h (B-E). Die Isotypkontrolle (grauer Graph) und die gefärbten NKT-Zellen (schwarzer Graph) werden gezeigt. Dabei sind der MFI-Wert und die Prozentzahl der CD69-exprimierenden NKT-Zellen unter Berücksichtigung der Isotypkontrolle abgebildet. Von vier getesteten ist ein repräsentativer Spender dargestellt.

3.3.2 Modulation des Zytokinprofils von NKT-Zellen durch slanDCs

Aktiviert NKT-Zellen produzieren als frühe Effektorzellen einer antitumoralen Immunantwort Zytokine, wie IFN- γ oder IL-4. Damit können sie sowohl die Ausbildung einer zellulären als auch einer humoralen Immunreaktion unterstützen (Fujii *et al.*, 2007; Van Kaer, 2007). Aus diesem Grund wurde der Einfluss von slanDCs auf die IFN- γ - und die IL-4-Sekretion von NKT-Zellen untersucht. Dazu erfolgte die Kokultur von NKT-Zellen mit murenen slanDCs in Ab- oder Anwesenheit von LPS. Anschließend wurden die Konzentrationen von IFN- γ und IL-4 mittels ELISA quantifiziert (Gliederungspunkt 2.2.8). Die Resultate ergaben, dass LPS-aktivierte slanDCs eine IFN- γ -Produktion in NKT-Zellen induzieren, während unstimulierte slanDCs keinen Einfluss auf die Zytokinproduktion von NKT-Zellen ausüben (Abb. 28, A). Im Gegensatz dazu produzierten NKT-Zellen unter den hier verwendeten Kulturbedingungen keine wesentlichen Mengen an IL-4 (Abb. 28, B).

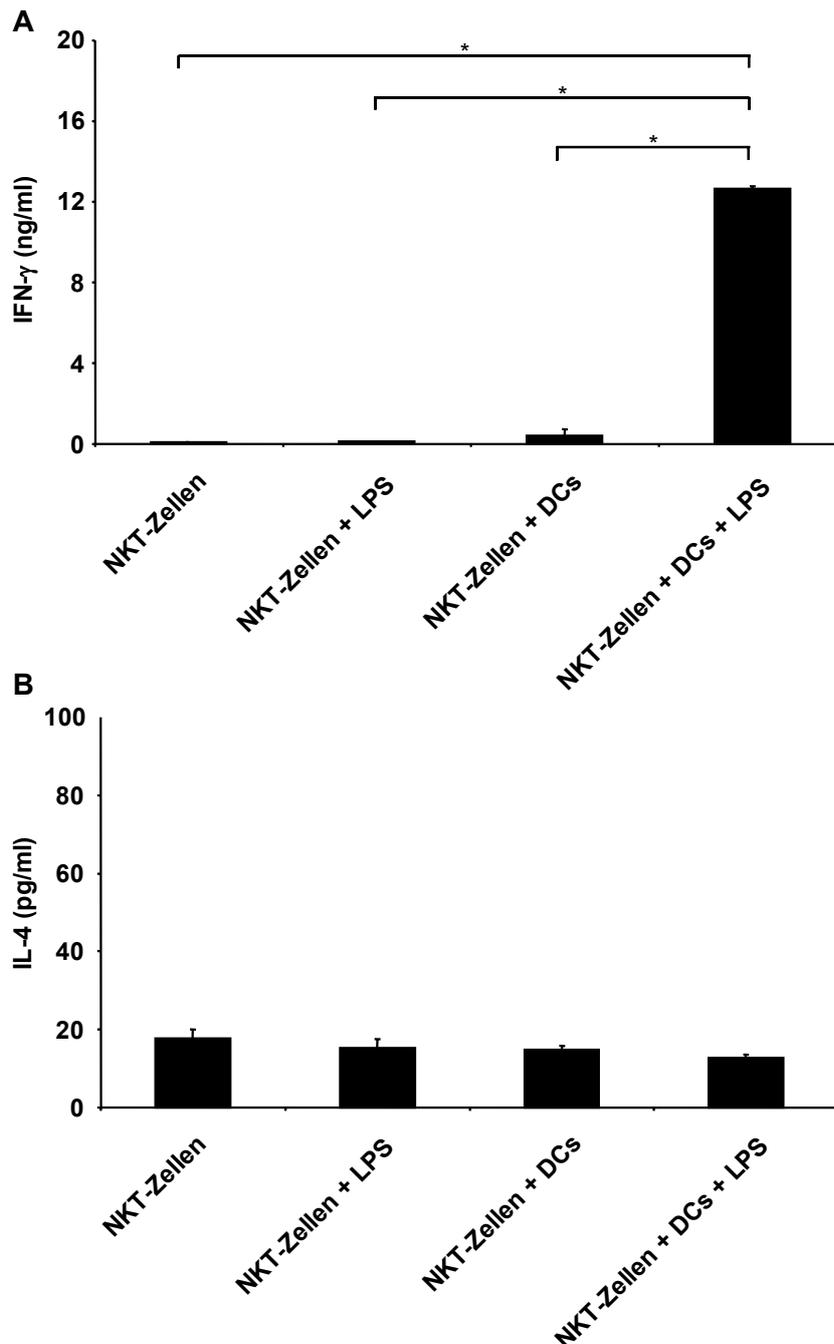


Abbildung 28: Wirkung von slanDCs auf die IFN- γ - und die IL-4-Produktion von NKT-Zellen.

NKT-Zellen ($2,5 \times 10^5$) wurden in An- oder Abwesenheit von reifen slanDCs (1×10^5) mit oder ohne LPS inkubiert. Nach 24 h erfolgten die Ernte der Zellkulturüberstände und die Bestimmung der Konzentrationen von IFN- γ (A) und IL-4 (B) mittels ELISA. Die Daten zeigen Mittelwerte einer Doppelbestimmung, deren Standardabweichungen und die statistische Signifikanz (* $p \leq 0,05$). Von vier getesteten ist ein repräsentativer Spender abgebildet.

Ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit, die dokumentierten, dass slanDCs die IFN- γ -Produktion von NK-Zellen durch Sekretion von IL-12 stimulieren (Gliederungspunkt 3.1.4), wurde untersucht, ob dieses immunmodulatorische Zytokin auch auf die IFN- γ -Freisetzung von NKT-Zellen wirkt. Es erfolgte die Kokultur von NKT-Zellen und murenen slanDCs mit LPS in An- oder Abwesenheit von blockierenden anti-IL-12-Antikörpern. Als Ergebnis zeigte sich, dass die Neutralisation von IL-12 zu einer signifikanten Reduktion der IFN- γ -Sekretion führt (Abb. 29). Dagegen wiesen NKT-Zellen, die in Abwesenheit von Antikörpern oder in Gegenwart von Isotyp-Kontroll-Antikörpern inkubiert wurden, eine unverändert hohe Freisetzung von IFN- γ auf. Die slanDC-induzierte IFN- γ -Produktion von NKT-Zellen erfolgt somit unter Beteiligung von IL-12.

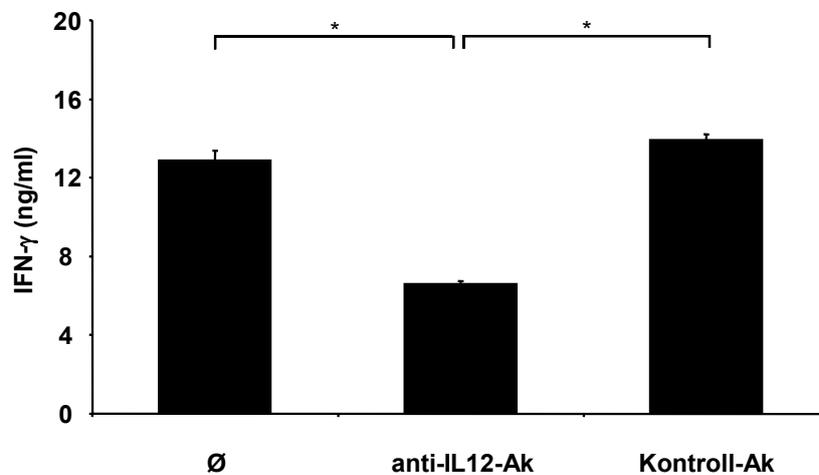


Abbildung 29: Einfluss von IL-12 auf die slanDC-induzierte IFN- γ -Sekretion von NKT-Zellen.

NKT-Zellen ($2,5 \times 10^5$) und ausgereifte slanDCs (1×10^5) wurden in Anwesenheit von LPS sowie anti-IL-12-Antikörpern oder Isotyp-Kontroll-Antikörpern kultiviert. Nach 24 h erfolgten die Ernte der Zellkulturüberstände und die Bestimmung der IFN- γ -Konzentrationen mittels ELISA. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte einer Doppelbestimmung, die Standardabweichungen der Mittelwerte und die statistische Signifikanz der Daten (* $p \leq 0,05$). Von vier untersuchten ist ein repräsentativer Spender abgebildet.

3.3.3 Beeinflussung der Maturierung von slanDCs durch NKT-Zellen

Die durchgeführten Experimente dokumentierten, dass NK-Zellen die Maturierung von slanDCs fördern (Gliederungspunkt 3.2.2). Da NKT-Zellen ebenfalls immunmodulatorisch wirken, wurde untersucht, ob sie die Reifung von slanDCs beeinflussen. Im Rahmen der Maturierung erfolgt die verstärkte Expression von MHC-Molekülen, kostimulatorischen Molekülen und Adhäsionsmolekülen. Um die Wirkung von NKT-Zellen auf die Expression von HLA-DR, CD86, ICAM-1 und CD83 auf der Oberfläche von slanDCs zu analysieren, wurden die beiden Zellpopulationen isoliert und kokultiviert. Die Expression der verschiedenen Moleküle wurde mittels Durchflusszytometrie charakterisiert (Gliederungspunkt 2.2.7). Die erhöhte Expressionsdichte von HLA-DR, CD86, ICAM-1 und CD83 auf der Oberfläche von slanDCs zeigte, dass NKT-Zellen die Maturierung von slanDCs erheblich steigern (Abb. 30-33, C). Darüber hinaus wurde der prozentuale Anteil der CD83-exprimierenden slanDCs durch NKT-Zellen deutlich erhöht (Abb. 33, C). Die Daten von slanDCs, die ohne NK-Zellen kultiviert wurden, veranschaulichten die spontane Ausreifung von slanDCs *in vitro* (Abb. 30-33, B).

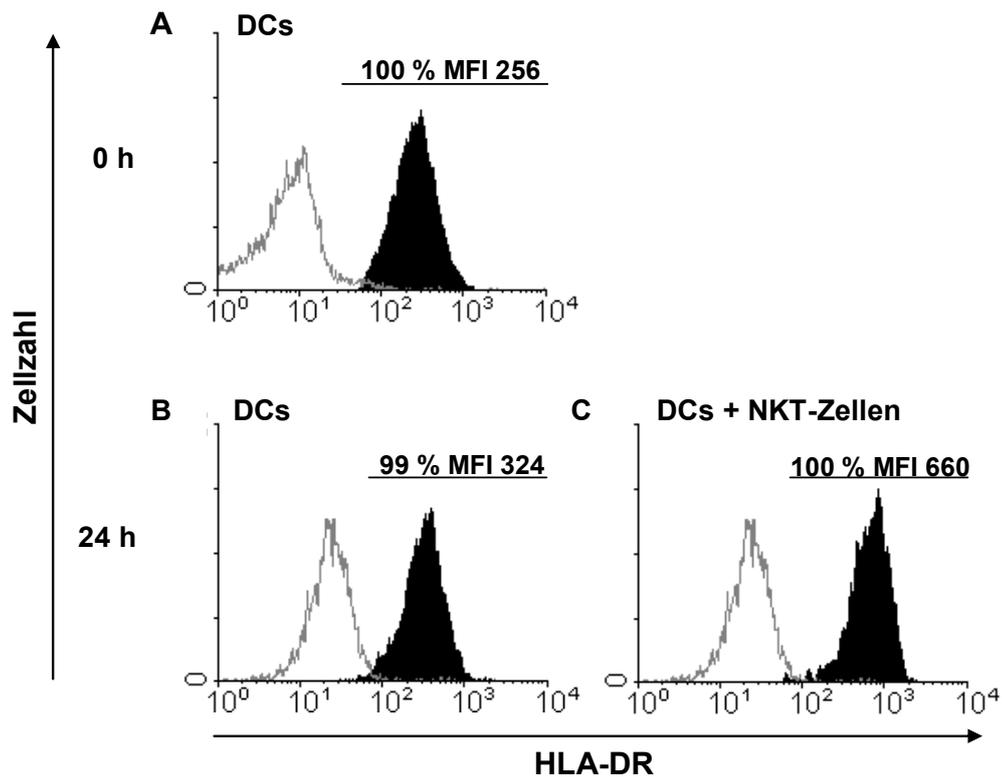


Abbildung 30: Einfluss von NKT-Zellen auf die HLA-DR-Expression von slanDCs. Frisch isolierte slanDCs (1×10^5) wurden ohne (B) oder mit (C) NKT-Zellen (1×10^5) kultiviert, danach geerntet, gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Färbung erfolgte nach 0 h (A) und 24 h (B, C). Die Isotypkontrolle (grauer Graph) und die mit anti-HLA-DR-Antikörpern gefärbten slanDCs (schwarzer Graph) sind dargestellt. Außerdem werden der MFI-Wert und die Prozentzahl der HLA-DR-exprimierenden slanDCs unter Berücksichtigung der Isotypkontrolle gezeigt. Von fünf getesteten ist ein repräsentativer Spender dargestellt.

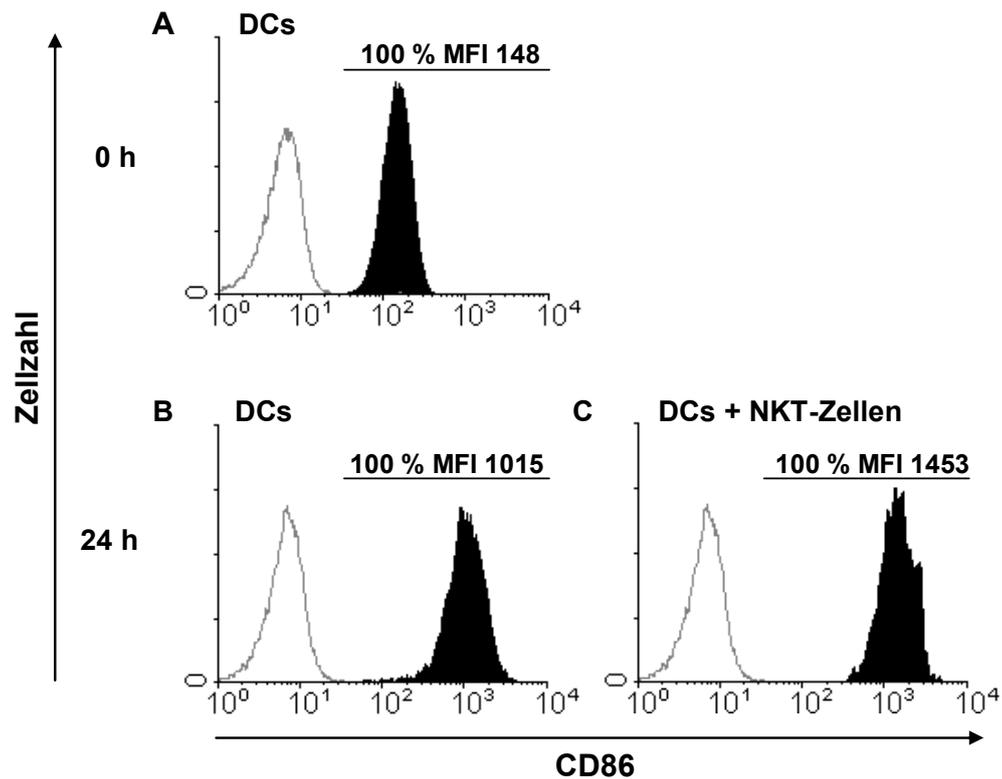


Abbildung 31: Wirkung von NKT-Zellen auf die CD86-Expression von slanDCs. SlanDCs (1×10^5) wurden in Ab- (B) oder Anwesenheit (C) von NKT-Zellen (1×10^5) kultiviert. Nach 0 h (A) und 24 h (B, C) wurde die Expression von CD86 durch Färbung der Zellen mit anti-CD86-Antikörpern bestimmt. Abgebildet sind die Isotypkontrolle (grauer Graph) und die gefärbten slanDCs (schwarzer Graph) zusammen mit dem MFI-Wert und der Prozentzahl der CD86-exprimierenden slanDCs unter Berücksichtigung der Isotypkontrolle. Von fünf untersuchten ist ein repräsentativer Spender dargestellt.

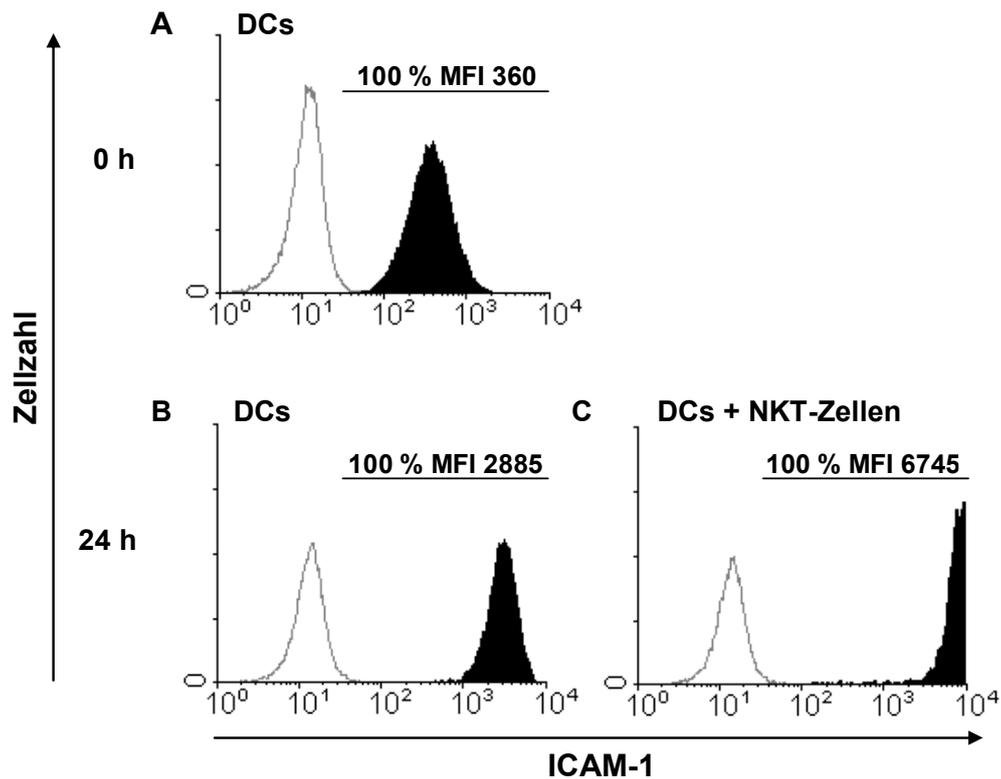


Abbildung 32: Einfluss von NKT-Zellen auf die ICAM-1-Expression von slanDCs. SlanDCs (1×10^5) wurden ohne (B) oder mit (C) NKT-Zellen (1×10^5) inkubiert. Nach 0 h (A) und 24 h (B, C) erfolgte die Analyse der Zellen im Durchflusszytometer. Die Isotypkontrolle (grauer Graph) und die mit anti-ICAM-1-Antikörpern gefärbten slanDCs (schwarzer Graph) sind dargestellt. Außerdem werden der MFI-Wert und die Prozentzahl der ICAM-1-exprimierenden slanDCs unter Berücksichtigung der Isotypkontrolle gezeigt. Von fünf getesteten ist ein repräsentativer Spender abgebildet.

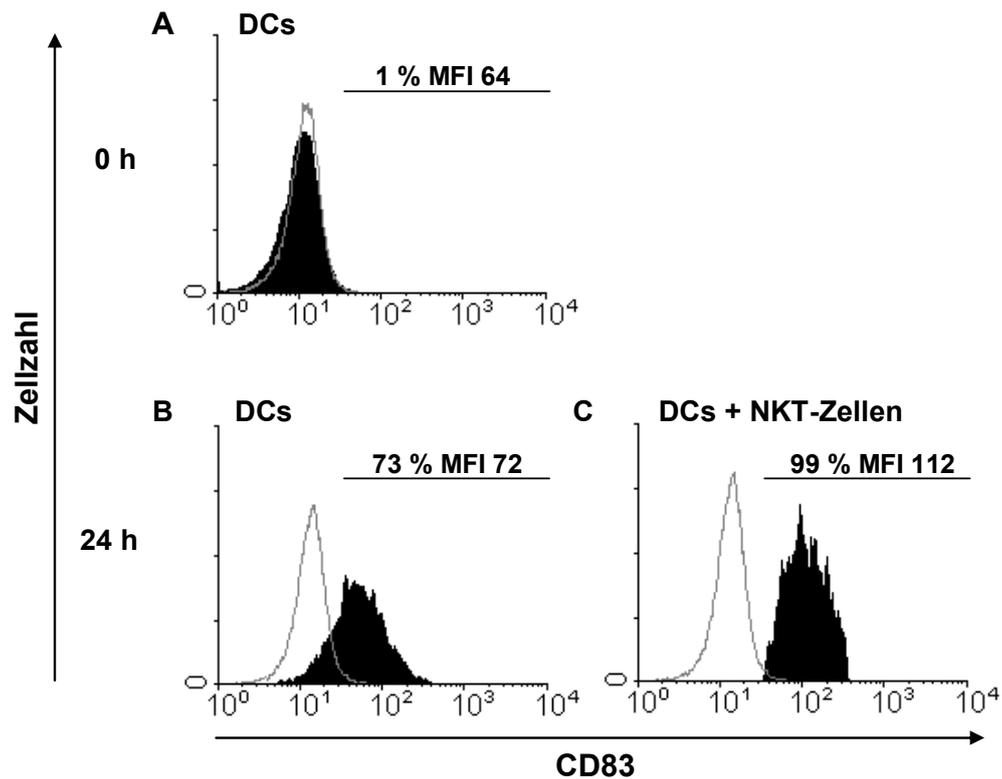


Abbildung 33: Wirkung von NKT-Zellen auf die Expression von CD83 auf der Oberfläche von slanDCs.

Frisch isolierte slanDCs (1×10^5) wurden in Ab- (B) oder Anwesenheit (C) von NKT-Zellen (1×10^5) kultiviert. Nach 0 h (A) und 24 h (B, C) wurde die Expression von CD83 im Durchflusszytometer bestimmt. Gezeigt werden die Isotypkontrolle (grauer Graph) und die gefärbten slanDCs (schwarzer Graph) zusammen mit dem MFI-Wert und der Prozentzahl der CD83-exprimierenden slanDCs unter Berücksichtigung der Isotypkontrolle. Ein repräsentativer von fünf untersuchten Spendern ist dargestellt.

3.3.4 Modifikation des Zytokinprofils von slanDCs durch NKT-Zellen

DCs bestimmen durch Sekretion von Zytokinen, wie IL-12 und IL-10, die Differenzierung einer Immunantwort. Ausgehend von Untersuchungen mit NK-Zellen, welche die IL-12-Produktion von slanDCs steigerten und die IL-10-Sekretion reduzierten (Gliederungspunkt 3.2.3), wurde nun der Einfluss von NKT-Zellen auf die Zytokinproduktion von slanDCs evaluiert. SlanDCs und NKT-Zellen wurden aus dem Blut gesunder Spender isoliert und in An- oder Abwesenheit von LPS kultiviert. Die Quantifizierung von IL-12 und IL-10 erfolgte mittels ELISA (Gliederungspunkt 2.2.8). Die Daten demonstrierten, dass NKT-Zellen die IL-12-Produktion LPS-aktivierter slanDCs signifikant verstärken (Abb. 34). Dagegen reduzierten NKT-Zellen die Freisetzung von IL-10 durch LPS-stimulierte slanDCs (Abb. 35). In unstimulierten slanDCs beeinflussen NKT-Zellen weder die Sekretion von IL-12 noch von IL-10. Mit Hilfe von intrazytoplasmatischen Färbungen wurde im Durchflusszytometer gezeigt, dass NKT-Zellen weder IL-12 noch IL-10 produzieren.

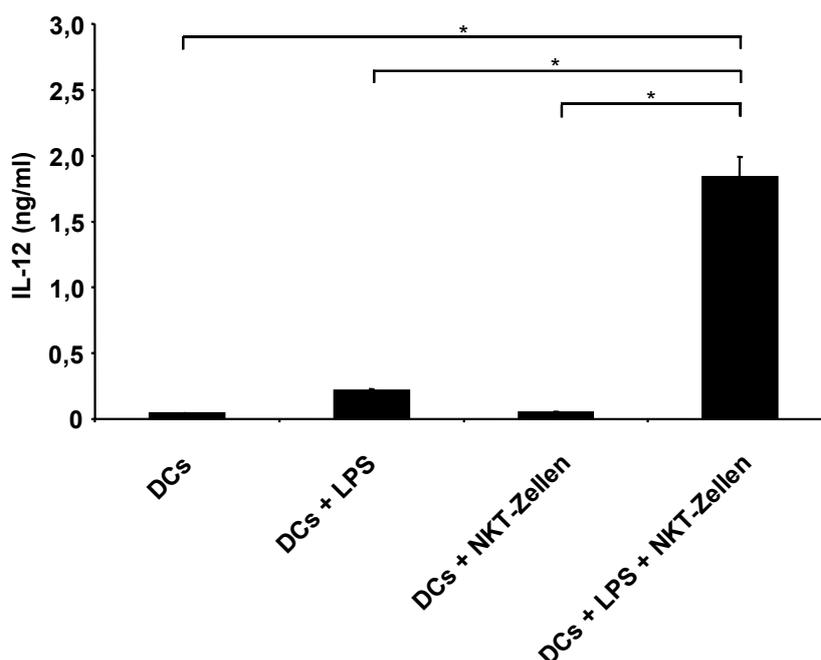


Abbildung 34: IL-12-Produktion von slanDCs nach Kokultur mit NKT-Zellen.

SlanDCs (1×10^5) wurden mit und ohne NKT-Zellen (1×10^5) in Ab- oder Anwesenheit von LPS für 24 h inkubiert. Die Analyse der Zellkulturüberstände erfolgte mittels IL-12-ELISA. Die Mittelwerte einer Doppelbestimmung, die Standardabweichungen der Mittelwerte und die statistische Signifikanz sind angegeben (* $p \leq 0,05$). Von drei untersuchten ist ein repräsentativer Spender dargestellt.

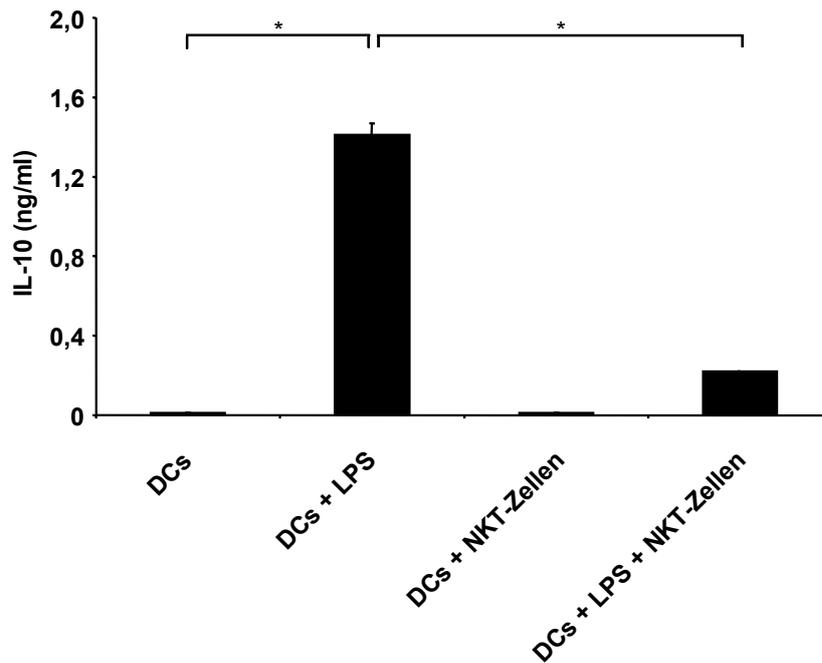


Abbildung 35: IL-10-Produktion von slanDCs nach Kokultur mit NKT-Zellen. SlanDCs (1×10^5) wurden in An- oder Abwesenheit von NKT-Zellen (1×10^5) und LPS kultiviert. Nach 48 h erfolgte die Ernte der Zellkulturüberstände und die IL-10-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. Die Mittelwerte einer Doppelbestimmung, die Standardabweichungen der Mittelwerte und die statistische Signifikanz sind angegeben (* $p \leq 0,05$). Von drei getesteten ist ein repräsentativer Spender dargestellt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrierten, dass die NK-Zell-modulierte Zytokinfreisetzung der slanDCs in Abhängigkeit von $\text{IFN-}\gamma$ erfolgt (Gliederungspunkt 3.1.4). Da NKT-Zellen ebenfalls $\text{IFN-}\gamma$ produzieren, wurde dessen Wirkung auf die IL-12- und die IL-10-Freisetzung von slanDCs untersucht. Dafür wurde die Zytokinproduktion von LPS-stimulierten slanDCs nach Kokultur mit NKT-Zellen in Anwesenheit von neutralisierenden anti- $\text{IFN-}\gamma$ -Antikörpern bestimmt. Die Blockade von $\text{IFN-}\gamma$ führte zu einer erheblichen Reduktion der IL-12-Produktion und einer Erhöhung der IL-10-Freisetzung (Abb. 36 und 37). Somit verstärkten NKT-Zellen die proinflammatorischen Fähigkeiten von slanDCs durch Produktion von $\text{IFN-}\gamma$, das sowohl an der Steigerung der IL-12- als auch an der Reduktion der IL-10-Sekretion beteiligt ist.

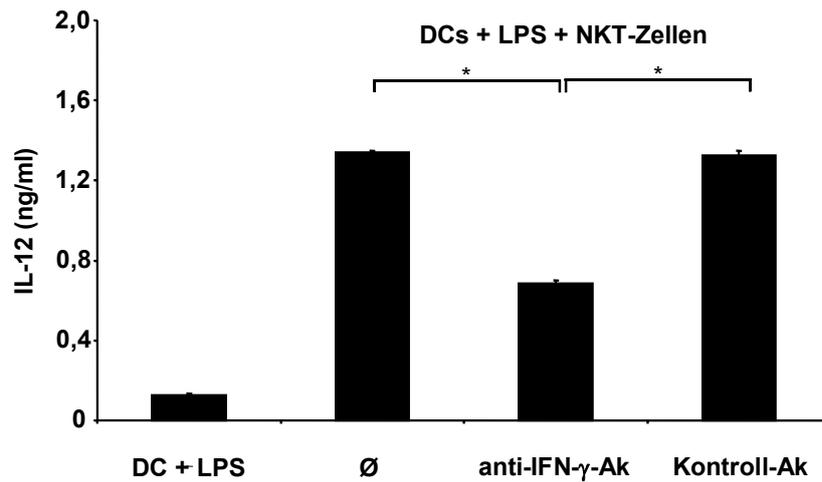


Abbildung 36: Wirkung von IFN- γ auf die NKT-Zell-vermittelte Steigerung der IL-12-Produktion von slanDCs.

SlanDCs (1×10^5) und NKT-Zellen (1×10^5) wurden mit LPS in An- oder Abwesenheit von anti-IFN- γ -Antikörpern sowie Isotyp-Kontroll-Antikörpern kultiviert. Nach 24 h wurden die Zellkulturüberstände geerntet und die IL-12-Konzentrationen mittels ELISA quantifiziert. Die Mittelwerte einer Doppelbestimmung, deren Standardabweichungen und die statistische Signifikanz sind dargestellt (* $p \leq 0,05$). Von drei untersuchten ist ein repräsentativer Spender abgebildet.

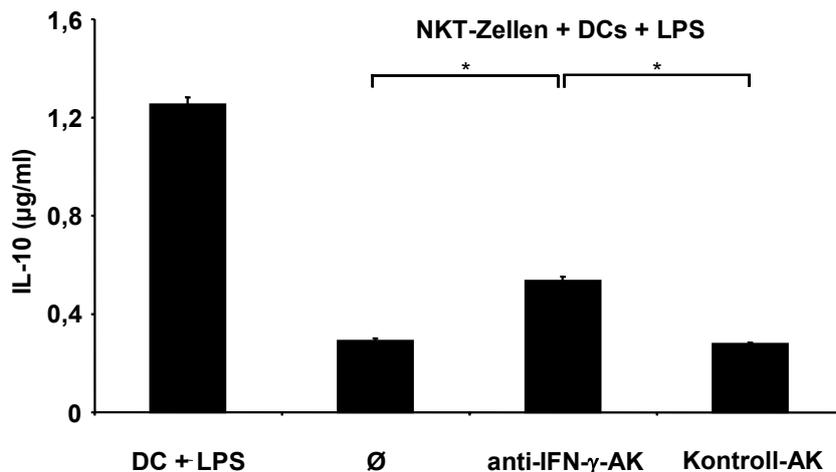


Abbildung 37: Einfluss von IFN- γ auf die NKT-Zell-vermittelte Reduktion der IL-10-Produktion von slanDCs.

SlanDCs (1×10^5) und NKT-Zellen (1×10^5) wurden mit LPS in An- oder Abwesenheit von anti-IFN- γ -Antikörpern sowie Isotyp-Kontroll-Antikörpern kultiviert. Nach 48 h erfolgten die Ernte der Zellkulturüberstände und die Quantifizierung der IL-12-Konzentrationen mittels ELISA. Es sind die Mittelwerte einer Doppelbestimmung, die Standardabweichungen der Mittelwerte und die statistische Signifikanz abgebildet (* $p \leq 0,05$). Von drei untersuchten ist ein repräsentativer Spender dargestellt.

Die erstmals in dieser Arbeit evaluierten Wechselwirkungen zwischen slanDCs und NKT-Zellen führen zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und zu einer verstärkten Maturierung von slanDCs. Diese Vorgänge sind von hoher Relevanz in der Ausbildung einer antitumoralen Entzündungsreaktion und der Aktivierung Tumorspezifischer T-Lymphozyten.

4 Diskussion

4.1 Dendritische Zellen als Aktivatoren einer spezifischen T-Zell-Antwort

DCs sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen und durch die Fähigkeit zur effizienten Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von Antigenen gekennzeichnet. Durch die hohe Expression von MHC-Peptid-Komplexen und kostimulatorischen Molekülen können DCs effektiv naive $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten aktivieren (Banchereau, 2000; Lee und Iwasaki, 2007; Ueno *et al.*, 2007). DCs entwickeln sich im Knochenmark und wandern in die peripheren Organe, bevorzugt in Areale mit häufigem Antigenkontakt. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich DCs in einem immaturren Zustand, der durch eine hohe Kapazität zur Antigenaufnahme und eine geringe Expression von MHC-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen charakterisiert ist. In den Geweben bewirken Tumor- oder Pathogen-assoziierte Moleküle und proinflammatorische Zytokine die funktionelle Reifung der DCs. Nach Migration in die regionären Lymphknoten sind mature DCs aufgrund der hohen Expression von MHC-Peptid-Komplexen und kostimulatorischen Molekülen effizient in der Lage, naive T-Lymphozyten zu aktivieren (Brode *et al.*, 2004; Angeli und Randolph, 2006; Macagno *et al.*, 2007; Sabatté *et al.*, 2007). Darüber hinaus setzen DCs Zytokine frei und steuern die Differenzierung und Expansion von $CD8^+$ CTLs und $CD4^+$ T-Helfer-Zellen (Van der Merwe und Davis, 2003). Dabei stellte sich heraus, dass Th1-Zellen die Ausbildung einer antitumoralen Immunantwort fördern. Th1-Zellen führen zu einer effektiveren Aktivierung von $CD8^+$ CTLs durch Produktion von IL-2 und die Verstärkung der Antigenpräsentationsfähigkeit von DCs. Th1-Zellen und $CD8^+$ CTLs tragen durch Induktion einer proinflammatorischen Immunantwort und die direkte Zytolyse zur Elimination von Tumorzellen bei (Boyman *et al.*, 2007; Sato und Fujita, 2007).

Die Fähigkeit von DCs zur Stimulation einer antitumoralen T-Zell-vermittelten Immunantwort prädestiniert DCs für die Immuntherapie von Tumoren. Untersuchungen an verschiedenen Mausmodellen haben gezeigt, dass die Vakzination mit DCs sowohl das Anwachsen von Tumoren verhindert, als auch eine Regression etablierter Tumoren erzielt (Zitvogel *et al.*, 1996; Nair *et al.*, 2000; Banchereau und Palucka, 2005). In klinischen Studien wurden DCs *ex vivo* mit Tumor-assoziierten Antigenen beladen und nachfolgend Tumorpatienten appliziert. Dies führte zur Induktion Tumorantigen-reaktiver T-Lymphozyten und zur Tumorregression (Nestle *et al.*, 1998; Thurner *et al.*, 1999; Wierocky *et al.*, 2006).

4.2 Aktivierung von NK-Zellen durch dendritische Zellen

4.2.1 Wirkung von dendritischen Zellen auf den Phänotyp von NK-Zellen

In den letzten Jahren zeigten Studien, dass DCs neben ihrer Fähigkeit zur effektiven Stimulation von T-Lymphozyten auch NK-Zellen als zelluläre Komponenten des angeborenen Immunsystems aktivieren können. Dies führt zu einer verstärkten Lyse von Tumorzellen sowie zur Sekretion von Zytokinen und trägt damit wesentlich zur Elimination von Tumoren bei (Walzer *et al.*, 2005 B; Smyth *et al.*, 2005; Moretta *et al.*, 2006). Die gewonnenen Erkenntnisse stützen sich jedoch hauptsächlich auf Untersuchungen am Mausmodell oder Experimente mit artifiziellen humanen DCs, die mit Hilfe von verschiedenen Zytokinen über mehrere Tage aus CD14⁺ Monozyten oder CD34⁺ Stammzellen generiert wurden. Diese Daten lassen daher nur bedingt Rückschlüsse auf die *in vivo*-Situation im Menschen zu. Deshalb bestand ein wesentliches Ziel dieser Arbeit in der Charakterisierung der Interaktionen zwischen NK-Zellen und nativen humanen DCs. Dazu wurden slanDCs verwendet, welche die größte humane DC-Subpopulation des Blutes repräsentieren. Aktivierte slanDCs zeichnen sich durch eine hohe Produktion des proinflammatorischen Zytokins TNF- α und des immunmodulatorischen Zytokins IL-12 aus (Schäkel *et al.*, 2002; Schäkel *et al.*, 2006). Funktionelle Analysen ergaben, dass slanDCs effektiv Antigen-spezifische CD4⁺ T-Lymphozyten und Tumor-reaktive CD8⁺ CTLs aktivieren (Schäkel *et al.*, 1998; Schäkel *et al.*, 2002). LPS-stimulierte slanDCs sind zu einer IL-12-vermittelten Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Lymphozyten in Th1-Zellen fähig (Schäkel *et al.*, 2006). Ferner vermitteln slanDCs eine Antikörper-abhängige oder -unabhängige Tumorzellyse (Schmitz *et al.*, 2002; Schmitz *et al.*, 2005). In dieser Arbeit wurde dagegen analysiert, ob slanDCs die Elimination von Tumorzellen durch Beeinflussung von NK-Zellen fördern, da NK-Zellen durch Sekretion von Zytokinen und ihr zytolytisches Potential Effektorzellen der frühen antitumoralen Immunabwehr repräsentieren. Es erfolgte zunächst die Analyse des Einflusses von slanDCs auf NK-Zellen. Dafür wurden die beiden Zellpopulationen in hoher Reinheit aus dem Blut gesunder Spender isoliert und NK-Zellen mit ausgereiften slanDCs kokultiviert. Ausgehend von Erkenntnissen, die eine aktivierende Wirkung von LPS auf slanDCs dokumentierten (Schäkel *et al.*, 2006), erfolgte die Stimulation von slanDCs durch Zugabe von LPS. Zu Beginn der Untersuchungen wurde die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 und die Proliferation von NK-Zellen analysiert. Während der Aktivierung von NK-Zellen wird CD69 auf der Oberfläche der Immunzellen verstärkt exprimiert. Es wird angenommen, dass eine Quervernetzung der CD69-Moleküle auf NK-Zellen eine Verstärkung der Zytotoxizität zur Folge hat (Marzio *et al.*, 1999; Hébert, 2000). Die

Proliferation aktivierter NK-Zellen gewährleistet die Anwesenheit einer großen Zahl immunmodulatorischer und zytolytischer Zellen, um eine effiziente Elimination von Tumorzellen zu erreichen (Miller *et al.*, 2005; Walzer *et al.*, 2005 B). Die Daten dieser Arbeit zeigten, dass LPS-aktivierte slanDCs sowohl eine erhöhte Expression des Aktivierungsmarkers CD69 als auch eine verstärkte Proliferation von NK-Zellen induzieren. In Experimenten anderer Arbeitsgruppen erzielte die Kokultur von NK-Zellen und LPS-stimulierten MoDCs eine Zunahme der Expression von CD69 auf den zytotoxischen Zellen (Jinushi *et al.*, 2003; Vitale *et al.*, 2004). Eine Infektion von MoDCs mit Influenza-Viren oder eine Stimulation mit IFN- α führten ebenfalls zu einer DC-vermittelten Steigerung der CD69-Expression auf NK-Zellen (Gerosa *et al.*, 2005; Draghi *et al.*, 2007). Die Proliferation der zytotoxischen Zellen wurde von DCs gefördert, die sich von CD14⁺ Monozyten oder CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen ableiteten, wobei MoDCs die effektiveren Stimulatoren darstellten (Münz *et al.*, 2005 A). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass native DCs den Aktivierungszustand von NK-Zellen beeinflussen. So ergaben Untersuchungen mit Influenza-Virus-infizierten pDCs und polyI:C-stimulierten CD1c⁺ mDCs eine erhöhte Expressionsdichte von CD69 auf NK-Zellen (Gerosa *et al.*, 2005).

NK-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche aktivierende Rezeptoren und Korezeptoren, die nach Ligandenbindung stimulierende Signale generieren. Die Summation dieser Signale kann zur Aktivierung von NK-Zellen und somit zur Sekretion von Zytokinen führen sowie eine Tumor-gerichtete Zytotoxizität provozieren. Eine Vielzahl von Veröffentlichungen veranschaulicht, dass aktivierende NK-Zell-Rezeptoren wesentlich an der Lyse von verschiedenen Tumoren, wie Melanom-, Neuroblastomzellen sowie myeloiden und lymphoblastischen Leukämiezellen, beteiligt sind (Bottino *et al.*, 2005; Sentman *et al.*, 2006; Ruggeri *et al.*, 2007 B). Dabei wird davon ausgegangen, dass Tumorzellen verstärkt Liganden für aktivierende NK-Zell-Rezeptoren exprimieren und entsprechend der „stress-induced-self recognition“-Hypothese von NK-Zellen erkannt und eliminiert werden (Sentman *et al.*, 2006; Solana *et al.*, 2007; Verheyden und Demanet, 2007). Diese Erkenntnisse werden von Untersuchungen mit AML-Patienten bestätigt, die zeigten, dass Patienten mit NK-Zellen, die kaum NCRs exprimierten, eine schlechtere Prognose aufwiesen als Patienten, deren NK-Zellen ein normales NCR-Expressionsprofil besaßen (Fauriat *et al.*, 2007). Andere Studien dokumentierten, dass eine Stimulation der NK-Zellen von AML-Patienten mit IL-2 die Expression der aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren NKG2D und NKp46 normalisierte und zu einer Erhöhung des zytolytischen Potentials dieser NK-Zellen *in vitro* führte (Siegler *et al.*, 2005). Untersuchungen mit NK-Zellen gesunder Spender ergaben eine IL-2- oder IL-12-vermittelte Erhöhung der NKp30-, NKp46-, NKG2D-, 2B4- und DNAM-1-Expression, was mit einer gesteigerten

Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber Tumorzellen korrelierte (Castriconi *et al.*, 2003; Macenaro *et al.*, 2005; Bryceson *et al.*, 2006 B). Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig der Einfluss von nativen slanDCs auf die Expression aktivierender NK-Zell-Rezeptoren und Korezeptoren evaluiert. Dabei verstärkten LPS-aktivierte slanDCs die Expression von NKp46, NKp44 und NKp30 auf der Oberfläche von NK-Zellen. Darüber hinaus bewirkten LPS-stimulierte slanDCs eine erhöhte Expression der Korezeptoren 2B4 und DNAM-1. Diese Ergebnisse demonstrierten, dass stimulierte slanDCs zu einer Steigerung der Expression von aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren führen, die wesentlich am zytotoxischen Potential der NK-Zellen beteiligt sind.

4.2.2 Beeinflussung der Zytokinproduktion und der Zytotoxizität von NK-Zellen durch dendritische Zellen

Aktivierte NK-Zellen zeichnen sich durch eine effektive Produktion des immunmodulatorischen Moleküls IFN- γ aus. Dieses Zytokin inhibiert die Proliferation und die Proteinbiosynthese von Tumorzellen sowie die Angiogenese von Tumoren (Qin und Blankenstein, 2000; Young und Bream, 2007). Des Weiteren aktiviert IFN- γ Effektorzellen des natürlichen und des adaptiven Immunsystems, wie Makrophagen und Th1-Lymphozyten. Dabei unterstützt es die Ausbildung einer proinflammatorischen Immunantwort (Schroder *et al.*, 2004; Schoenborn und Wilson, 2007). Ausgehend von der hohen Relevanz, die dieses Zytokin in der Immunabwehr von Tumoren hat, wurde der Einfluss von slanDCs auf die IFN- γ -Produktion von NK-Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass LPS-aktivierte slanDCs eine erhebliche IFN- γ -Freisetzung in NK-Zellen induzieren. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe dokumentierten, dass IFN- γ -stimulierte slanDCs eine wesentlich höhere IFN- γ -Sekretion durch NK-Zellen bewirken als IFN- γ -aktivierte MoDCs (Schmitz *et al.*, 2005). Influenza-Virus-infizierte und Bakterien-stimulierte MoDCs förderten ebenfalls eine Produktion von IFN- γ durch NK-Zellen (Ferlazzo *et al.*, 2003; Draghi *et al.*, 2007). Untersuchungen mit nativen DCs ergaben, dass polyI:C-aktivierte CD1c⁺ mDCs sowie CpG-DNA-stimulierte pDCs zu einer Freisetzung von IFN- γ durch NK-Zellen führen (Gerosa *et al.*, 2005; Marshall *et al.*, 2005; Romagnani *et al.*, 2005; Della Chiesa *et al.*, 2006). Neben der Produktion von immunmodulatorischen Zytokinen besitzen aktivierte NK-Zellen ein ausgeprägtes zytotoxisches Potential gegenüber Tumorzellen (Di Santo *et al.*, 2006). Deshalb wurde in funktionellen Analysen der Einfluss von slanDCs auf die Zytotoxizität von NK-Zellen evaluiert. Die lytische Aktivität von NK-Zellen wurde dabei zuerst gegenüber der CML-

Linie K562 getestet. Diese Tumorzellen besitzen eine hohe Sensitivität gegenüber NK-Zellen, da sie auf ihrer Oberfläche nur eine geringe Dichte von MHC-Klasse I-Molekülen aufweisen. Dieser Mangel an Liganden für inhibierende NK-Zell-Rezeptoren ist für die Aktivierung der Zytotoxizität von NK-Zellen ausreichend. LPS-aktivierte slanDCs waren in der Lage, diese NK-Zell-vermittelte Lyse von K562-Zellen signifikant zu verstärken. Andere Arbeitsgruppen zeigten, dass die Stimulation von MoDCs mit LPS-, polyI:C, dem CD40-Liganden oder IFN- α die Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien fördert (Jinushi *et al.*, 2003; Mailliard *et al.*, 2003). Außerdem dokumentierten Studien mit nativen DCs, dass IL-3- und CpG-DNA-aktivierte pDCs eine Verstärkung des zytotoxischen Potentials von NK-Zellen bewirken (Romagnani *et al.*, 2005; Della Chiesa *et al.*, 2006).

Vor einiger Zeit ergaben sich Hinweise, dass NK-Zellen bei der Elimination von AML-Blasten eine bedeutende Rolle im Rahmen einer Stammzelltransplantation spielen. Dabei erkannten und lysierten NK-Zellen des Spenders die Leukämiezellen des Empfängers. Dieses gesteigerte zytotoxische Potential von NK-Zellen beruhte auf einem KIR-Liganden-„mismatch“, der zur Reduktion von inhibitorischen Signalen führte und eine Aktivierung der Spender-NK-Zellen bewirkte (Beelen *et al.*, 2005; Ruggeri *et al.*, 2008). Außerdem wurde kürzlich dokumentiert, dass der adoptive Transfer von alloreaktiven NK-Zellen die Überlebensrate von AML-Patienten verbessert (Miller *et al.*, 2005; Woan und Reddy, 2007; Ruggeri *et al.*, 2007 B). Aufgrund dieser Daten war es im Rahmen dieser Arbeit von besonderem Interesse, den Einfluss von slanDCs auf das zytotoxische Potential von NK-Zellen gegenüber frisch etablierten AML-Blasten zu untersuchen. Dabei stellte sich heraus, dass unstimulierte NK-Zellen AML-Blasten nicht lysieren konnten, was auf eine geringe NK-Zell-Sensitivität dieser Tumorzellen hinweist. Im Gegensatz dazu induzierten LPS-aktivierte slanDCs eine deutliche zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gegenüber AML-Blasten. Diese Daten weisen auf die bedeutende Rolle von DCs bei der NK-Zell-vermittelten Elimination von Tumorzellen hin.

4.2.3 Zugrunde liegende Mechanismen der Aktivierung von NK-Zellen durch dendritische Zellen

Ausgehend von der Beobachtung, dass LPS-aktivierte slanDCs wesentliche Produzenten von IL-12 sind (Schäkel *et al.*, 2006), wurde der Einfluss dieses Zytokins auf die NK-Zell-aktivierenden Fähigkeiten von slanDCs evaluiert. Die Neutralisation von IL-12 führte zu einer fast vollständigen Inhibition der IFN- γ -Produktion und zur Reduktion des erhöhten zytotoxischen Potentials von NK-Zellen, deren Aktivierung durch LPS-stimulierte slanDCs

erfolgte. Untersuchungen mit IFN- γ -stimulierten slanDCs, die kein IL-12 produzierten, zeigten eine Steigerung der Aktivität von NK-Zellen in Abhängigkeit vom direkten Zell-Zell-Kontakt (Schmitz *et al.*, 2005). Somit aktivieren slanDCs unter dem Einfluss verschiedener stimulierender Moleküle NK-Zellen mit Hilfe unterschiedlicher Mechanismen. Diese Beobachtungen wurden von Studien anderer Arbeitsgruppen bestätigt, die demonstrierten, dass die aktivierende Wirkung von DCs auf NK-Zellen sowohl durch lösliche Faktoren als auch durch Membran-assoziierte Moleküle hervorgerufen werden kann. LPS-stimulierte MoDCs verstärkten beispielsweise die IFN- γ -Produktion von NK-Zellen in Abhängigkeit von IL-12 (Jinushi *et al.*, 2003). Untersuchungen mit nativen DCs zeigten, dass polyI:C-stimulierte CD1c⁺ mDCs und CpG-DNA-aktivierte pDCs IL-12-vermittelt die IFN- γ -Produktion und in Abhängigkeit von IFN- α das zytotoxische Potential von NK-Zellen erhöhen (Gerosa *et al.*, 2005; Romagnani *et al.*, 2005; Hanabuchi *et al.*, 2006). Neben der Sekretion von Zytokinen stimulieren DCs NK-Zellen durch direkten Zell-Zell-Kontakt. Dabei verstärken immature MoDCs durch Wechselwirkungen mit NKp30 die IFN- γ -Sekretion von NK-Zellen (Ferlazzo *et al.*, 2002). Rezeptor-Ligand-Interaktionen von NKG2D mit ULBPs sowie NKp46 mit Hämagglutinin auf NK-Zellen und Influenza-Virus-infizierten MoDCs führten zur Produktion von IFN- γ (Draghi *et al.*, 2007). Außerdem verstärkten LPS-aktivierte MoDCs die IFN- γ -Freisetzung und die Zytotoxizität von NK-Zellen durch Expression von MICA, einem Liganden für NKG2D (Jinushi *et al.*, 2003). Die Erkenntnisse der dargestellten Beobachtungen können in dem Modell einer immunologischen Synapse zwischen DCs und NK-Zellen zusammengefasst werden. Dabei sind sowohl die Interaktionen von Oberflächenmolekülen als auch die Sekretion von Zytokinen relevant. Der Zell-Zell-Kontakt von aktivierten MoDCs und NK-Zellen führte zur Neuorganisation von Oberflächenmolekülen und zur Ausbildung einer immunologischen Synapse. Danach erfolgte eine Polarisation des Zytoskeletts der MoDCs, und die Freisetzung von Zytokinen, wie IL-12, in den Bereich zwischen NK-Zellen und DCs (Borg *et al.*, 2004). Das Ergebnis ist eine gezielte Aktivierung von NK-Zellen durch DCs, ohne Nachbarzellen zu beeinflussen.

4.3 Modulation der immunstimulatorischen Eigenschaften dendritischer Zellen durch NK-Zellen

Während einige Studien die Fähigkeit von nativen DCs zur Aktivierung von NK-Zellen dokumentierten, ist umgekehrt über die Beeinflussung des Phänotyps und der Funktion von DCs durch NK-Zellen nur wenig bekannt. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die

Wirkung von NK-Zellen auf die immunstimulatorischen Fähigkeiten von DCs evaluiert. Es existieren Untersuchungen, die eine zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gegenüber unreifen MoDCs zeigen (Moretta *et al.*, 2006). Begründet wird diese zytotoxische Aktivität mit einer geringen Expressionsdichte von MHC-Klasse I-Molekülen auf der Oberfläche immaturer MoDCs und der Expression von Liganden für die aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren Nkp30 und DNAM-1 (Carbone *et al.*, 1999; Ferlazzo *et al.*, 2002; Pende *et al.*, 2006). Es wird angenommen, dass die NK-Zell-vermittelte Lyse unreifer DCs die Immunantwort terminieren soll (Vitale *et al.*, 2005; Zanoni *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu ergaben Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen keine NK-Zell-vermittelte Lyse von immaturren MoDCs (Mailliard *et al.*, 2003) sowie nativen pDCs (Gerosa *et al.*, 2005). Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Resultate bestätigten diese Beobachtungen und zeigten, dass NK-Zellen keinen Einfluss auf die Vitalität von slanDCs aufweisen. Die fehlende Zytolyse von slanDCs durch NK-Zellen könnte jedoch auf der verstärkten Expression von MHC-Molekülen während der in wenigen Stunden ablaufenden spontanen Maturierung beruhen.

Die vollständige Ausreifung der DCs ist eine wesentliche Voraussetzung für die Aktivierung Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ CTLs (Banchereau *et al.*, 2000; Steinman, 2007). Deshalb wurde analysiert, ob NK-Zellen die Maturierung von slanDCs beeinflussen. Die Ergebnisse demonstrierten, dass sich frisch aus dem Blut isolierte slanDCs durch eine geringe Expression von MHC-Klasse II-Molekülen, wie HLA-DR, kostimulatorischen Molekülen, wie CD86, und Adhäsionsmolekülen, wie ICAM-1, auszeichnen und kaum CD83 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Diese slanDCs wurden deshalb als unreif charakterisiert. Während der *in vitro*-Kultur reiften slanDCs ohne exogene Stimuli spontan aus, was durch eine Zunahme der HLA-DR-, CD86- und ICAM-1-Expression sowie den Anstieg des prozentualen Anteils CD83-exprimierender slanDCs deutlich wurde. Interessanterweise führten NK-Zellen zu einer erheblichen Verstärkung der Ausreifung von slanDCs. Diese Ergebnisse zeigten erstmals, dass unstimulierte NK-Zellen die Maturierung nativer DCs fördern. Die Resultate anderer Arbeitsgruppen beschrieben eine erhöhte Expression von CD83 und CD86 auf MoDCs, die mit NK-Zellen kultiviert wurden (Vitale *et al.*, 2005). Untersuchungen mit *in vitro*-generierten ruhenden sowie IL-12- oder IL-2-aktivierten NK-Zellen ergaben ebenfalls eine verstärkte Expression von CD83, CD86 und MHC-Klasse II-Molekülen auf der Oberfläche von MoDCs (Piccioli *et al.*, 2002; Marcenaro *et al.*, 2005; Semino *et al.*, 2005).

Vor kurzer Zeit charakterisierten vergleichende Analysen mit Monozyten, slanDCs und CD1c⁺ mDCs, slanDCs als Hauptproduzenten von IL-12. Dabei sekretierten ausgereifte slanDCs IL-12 nach Stimulation mit LPS oder dem CD40-Liganden (Schäkel *et al.*, 2006). Darüber hinaus demonstrierten die Resultate dieser Arbeit, dass IL-12 zu einer slanDC-

vermittelten Aktivierung von NK-Zellen führt. Dabei induzierte IL-12 die IFN- γ -Produktion und verstärkte das zytolytische Potential Tumor-reaktiver NK-Zellen. Es war deshalb von großem Interesse, den Einfluss von NK-Zellen auf die Sekretion von IL-12 durch slanDCs zu analysieren. Dabei zeigte sich, dass NK-Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der IL-12-Produktion LPS-aktivierter slanDCs in der Lage sind. Dagegen konnten NK-Zellen in unstimulierten slanDCs keine IL-12-Freisetzung provozieren. LPS-aktivierte MoDCs wiesen nach Kokultur mit NK-Zellen ebenfalls eine erhöhte IL-12-Produktion auf (Jinushi *et al.*, 2003). Die Aktivierung von NK-Zellen mit Hilfe von K562-Zellen förderte die IL-12-Freisetzung IFN- α -aktivierter MoDCs (Mailliard *et al.*, 2003). Darüber hinaus demonstrierten Analysen anderer Arbeitsgruppen eine Abhängigkeit der IL-12-Freisetzung LPS-stimulierter MoDCs von rekombinantem IFN- γ (Saito *et al.*, 2006; Frasca *et al.*, 2008). Da NK-Zellen nach der Kokultur mit LPS-aktivierten slanDCs IFN- γ produzieren, wurde der Einfluss dieses Zytokins auf die IL-12-Sekretion von slanDCs evaluiert. Die Versuche ergaben, dass IFN- γ eine bedeutende Rolle bei der NK-Zell-vermittelten Steigerung der IL-12-Produktion LPS-aktivierter slanDCs spielt. Diese Ergebnisse können mit einem Zwei-Signal-Modell erklärt werden (Snijders *et al.*, 1998). Dabei ist LPS das erste Signal, das DCs aktiviert und eine IL-12-Freisetzung induziert. NK-Zellen liefern durch die Sekretion von IFN- γ das zweite Signal, welches DCs stimuliert und eine deutliche Erhöhung der IL-12-Produktion bewirkt.

In weiteren Experimenten zeigte sich, dass LPS-aktivierte slanDCs IL-10 sekretieren. IL-10 ist ein antiinflammatorisches Molekül, das die Funktionen von Makrophagen sowie von Th1- und Th2-Zellen inhibiert. Diese Vorgänge führen zur Beendigung einer Immunreaktion (Conti *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2004; Howell *et al.*, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit war es nun von großem Interesse, die Wirkung von NK-Zellen auf die Sekretion des immunsuppressiven Zytokins zu untersuchen. Die Daten demonstrierten erstmalig eine deutliche NK-Zell-vermittelte Reduktion der IL-10-Freisetzung LPS-aktivierter slanDCs. In diesem Zusammenhang wurde ebenfalls der Einfluss von IFN- γ evaluiert und es zeigte sich, dass IFN- γ an der NK-Zell-induzierten Reduktion der IL-10-Produktion von LPS-aktivierten slanDCs beteiligt ist.

SlanDCs sind effizient in der Lage, Tumor-reaktive CD8⁺ CTLs sowie NK-Zellen zu aktivieren, die Tumorzellen direkt eliminieren (Schäkel *et al.*, 1998). Außerdem fördern slanDCs die Differenzierung von CD4⁺ T-Lymphozyten in Th1-Zellen, die durch die Sekretion von Zytokinen, wie IFN- γ , zur Ausbildung einer antitumoralen proinflammatorischen Immunantwort führen können (Wehner *et al.*, 2006; Straube *et al.*, 2007). Studien anderer Arbeitsgruppen ergaben, dass humane NK-Zellen durch IFN- γ -Produktion die Fähigkeit aktivierter MoDCs zur Differenzierung von Th1-Lymphozyten steigern (Morandi *et al.*, 2006). Ausgehend von diesen Resultaten war die Analyse des

Einflusses von NK-Zellen auf die slanDC-vermittelte Programmierung naiver CD4⁺ T-Lymphozyten von großer Bedeutung. Die Ergebnisse zeigten, dass die Interaktionen von LPS-stimulierten slanDCs und NK-Zellen zu einer signifikanten Verstärkung der IFN- γ -Produktion von CD4⁺ T-Lymphozyten führen. Dagegen wurde die geringe Sekretion des Th2-Zytokins IL-4 durch CD4⁺ T-Lymphozyten, während der gesamten Versuchsreihe nicht beeinflusst. Diese Stimulation von Th1-Zellen kann auf zwei verschiedenen Mechanismen beruhen. Einerseits verstärkten NK-Zellen, wie in dieser Arbeit gezeigt, die IL-12-Produktion LPS-aktivierter slanDCs, welches für die Programmierung von naiven CD4⁺ T-Lymphozyten essentiell ist (Schäkel *et al.*, 2006). Andererseits belegen Untersuchungen, dass NK-Zellen durch Sekretion von IFN- γ direkt die Entwicklung von Th1-Lymphozyten fördern können (Martín-Fontecha *et al.*, 2004).

4.4 Wechselwirkungen von NKT-Zellen und dendritischen Zellen

Die zu Beginn dieser Arbeit gewonnenen Resultate demonstrierten, dass slanDCs eine ausgeprägte Fähigkeit zur Aktivierung von NK-Zellen besitzen. Dabei stimulierten slanDCs die Proliferation der NK-Zellen, erhöhten die Expression von aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren, induzierten eine IFN- γ -Produktion und förderten die antitumorale zytotoxische Aktivität von NK-Zellen. Der Einfluss von NK-Zellen auf slanDCs wurde durch die verstärkte Maturierung, die Zunahme der IL-12- und die Reduktion der IL-10-Produktion sowie eine effizientere Th-1-Differenzierung durch slanDCs deutlich. Ausgehend von diesen Beobachtungen erfolgte die Analyse der Interaktionen zwischen slanDCs und NKT-Zellen, die ebenfalls als bedeutende Effektorzellen einer antitumoralen Immunantwort charakterisiert wurden (Smyth *et al.*, 2002; Terabe und Berzofsky, 2007). Die Aktivierung von NKT-Zellen erfolgt durch immunmodulatorische Zytokine, wie IL-12 und IL-18, sowie durch die Stimulation mit Glykolipiden (Seino *et al.*, 2006; Nagarajan und Kronenberg, 2007; Uchida *et al.*, 2008). Dabei tragen NKT-Zellen durch eine schnelle Sekretion immunmodulatorischer Zytokine, wie IFN- γ und TNF- α , zur Entwicklung einer Entzündungsreaktion bei. Darüber hinaus sind sie in der Lage, durch die Expression zytotoxischer Moleküle, wie TRAIL oder Fas-Ligand, Tumorzellen direkt durch Apoptoseinduktion zu eliminieren (Fujii *et al.* 2002; Mercer *et al.*, 2004; Kronenberg *et al.*, 2005; Mattarollo *et al.*, 2006). *In vitro*- und *in vivo*-Studien haben die Bedeutung der NKT-Zellen im Rahmen einer antitumoralen Immuntherapie gezeigt (Giaccone *et al.*, 2002; Nieda *et al.*, 2004; Teng *et al.*, 2007). In diesem Zusammenhang ergaben sich erste Hinweise, dass DCs die Fähigkeit zur Aktivierung von NKT-Zellen besitzen. Diese Erkenntnisse beruhen hauptsächlich auf Analysen mit murinen DCs (Minami *et al.*, 2005;

Fujii *et al.*, 2007; Shimizu *et al.*, 2007). Dagegen sind Erkenntnisse aus Untersuchungen mit humanen DCs begrenzt. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals die Interaktionen von slanDCs und NKT-Zellen evaluiert. Dazu erfolgten die Isolation der beiden Zellpopulationen aus dem Blut gesunder Spender und ihre Kokultur in An- oder Abwesenheit von LPS. Zunächst wurde die Wirkung von slanDCs auf die Expression von CD69 auf NKT-Zellen analysiert, da dieses Oberflächenmolekül ebenfalls einen Aktivierungsmarker von NKT-Zellen repräsentiert (Brigl *et al.*, 2003; Jukes *et al.*, 2007). Die Ergebnisse zeigten, dass LPS-aktivierte slanDCs zu einer deutlichen Erhöhung der Expressionsdichte von CD69 auf NKT-Zellen führen. CpG-DNA-stimulierte humane pDCs waren ebenfalls in der Lage, die CD69-Expression auf NKT-Zellen zu verstärken (Montoya *et al.*, 2006).

NKT-Zellen können die Elimination von Tumorzellen durch die schnelle Produktion proinflammatorischer Zytokine unterstützen (Minami *et al.*, 2005; Seino *et al.*, 2006). Deshalb wurde der Einfluss von slanDCs auf das Zytokinprofil von NKT-Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass LPS-aktivierte slanDCs in der Lage sind, eine deutliche Produktion von IFN- γ in NKT-Zellen zu induzieren. Dagegen wurden unter den verwendeten Kulturbedingungen keine wesentlichen Mengen an IL-4 von NKT-Zellen freigesetzt. Untersuchungen am Mausmodell ergaben, dass die Injektion von α -GalCer-beladenen DCs zu einer verstärkten und verlängerten IFN- γ -Produktion von Milz-NKT-Zellen führte. Die gleiche Studie dokumentierte jedoch neben dem Anstieg der IFN- γ - auch eine Zunahme der IL-4-Produktion (Fujii *et al.*, 2002). Außerdem führten murine DCs, die aus Knochenmarkzellen gezüchtet wurden, zu einer IFN- γ -Produktion von NKT-Zellen, die aus der Milz und der Leber von Mäusen isoliert wurden (Nagarajan und Kronenberg, 2007). Die Stimulation von humanen MoDCs mit *Salmonella typhimurium* oder *Staphylococcus aureus* förderte die IFN- γ - aber nicht die IL-4-Sekretion von NKT-Zellen (Brigl *et al.*, 2003). Da slanDCs, wie in dieser Arbeit gezeigt, IL-12-abhängig die IFN- γ -Produktion in NK-Zellen induzierten, wurde der Einfluss dieses Zytokins auf NKT-Zellen analysiert. Die Neutralisation von IL-12 führte zur Reduktion der slanDC-vermittelten IFN- γ -Produktion von NKT-Zellen, so dass die Daten erneut die zentrale Bedeutung von IL-12 bei der Aktivierung antitumoraler Effektorzellen demonstrieren. Insgesamt weisen die gewonnenen Erkenntnisse darauf hin, dass aktivierte slanDCs die proinflammatorische Wirkung von NKT-Zellen in Abhängigkeit von IL-12 verstärken. Untersuchungen am Mausmodell demonstrierten, dass α -GalCer-stimulierte murine Milz-DCs durch Freisetzung von IL-12 die IFN- γ -Produktion von NKT-Zellen stimulieren (Kitamura *et al.*, 1999). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass humane native pDCs eine IFN- γ -Freisetzung von NKT-Zellen durch direkten Zell-Zell-Kontakt und durch Sekretion von IFN- α bewirken (Marschner *et al.*, 2005).

Es ist bekannt, dass NKT-Zellen in der frühen Phase einer Immunantwort die Fähigkeiten von murinen DCs zur Aktivierung von CD4⁺ T-Lymphozyten und CD8⁺ CTLs unterstützen (Hermans *et al.*, 2003). Zusätzlich konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass NK-Zellen die Maturation von unstimulierten slanDCs verstärken. Dieser Vorgang ist essentiell für die Aktivierung von T-Lymphozyten. Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde hier erstmals analysiert, ob NKT-Zellen die Ausreifung von slanDCs beeinflussen. Repräsentativ für die komplexen Prozesse während der Maturation wurde die Expression der Markermoleküle CD83, CD86, HLA-DR und ICAM-1 untersucht. Die Experimente zeigten, dass NKT-Zellen zu einem deutlichen Anstieg der HLA-DR-, CD86- und ICAM-1-Expression sowie einer Zunahme des Anteils CD83-exprimierender slanDCs führen. In Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen verstärkten humane NKT-Zellen die CD80-, CD83- und CD86-Expression auf MoDCs, die mit α -GalCer oder dem TLR-4-Liganden Monophosphoryl-Lipid A stimuliert wurden (Hermans *et al.*, 2007). Wie in dieser Arbeit beschrieben, werden LPS-aktivierte slanDCs durch die Sekretion der Zytokine IL-12 und IL-10 charakterisiert, die eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Immunantwort spielen. Deshalb wurde der Einfluss von NKT-Zellen auf die IL-12- und die IL-10-Produktion von slanDCs untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass NKT-Zellen die IL-12-Freisetzung aktivierter slanDCs deutlich steigern. Dagegen waren NKT-Zellen nicht in der Lage, eine IL-12-Sekretion in unstimulierten slanDCs zu induzieren. Darüber hinaus reduzierten NKT-Zellen die IL-10-Freisetzung LPS-stimulierter slanDCs. Ausgehend von den Erkenntnissen, dass NK-Zellen IFN- γ -abhängig slanDCs stimulieren und dass NKT-Zellen zur Sekretion von IFN- γ in der Lage sind, wurde der Einfluss des immunmodulatorischen Zytokins auf die Sekretion von IL-12 und IL-10 analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass IFN- γ an der NKT-Zell-vermittelten Steigerung der IL-12-Produktion und der Reduktion der IL-10-Freisetzung LPS-aktivierter slanDCs beteiligt ist. Experimente am Mausmodell demonstrierten eine Abhängigkeit zwischen APC-produziertem IL-12 und NKT-Zell-sekretiertem IFN- γ innerhalb der Milz-Zell-Suspensionen von IFN- γ ^{-/-} „knock out“-Mäusen und normalen Mäusen (Yang *et al.*, 2000). Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen von slanDCs und NKT-Zellen, dass sich die beiden Zellpopulationen im humanen System wechselseitig stimulieren und zur Induktion einer starken proinflammatorischen Immunantwort führen können.

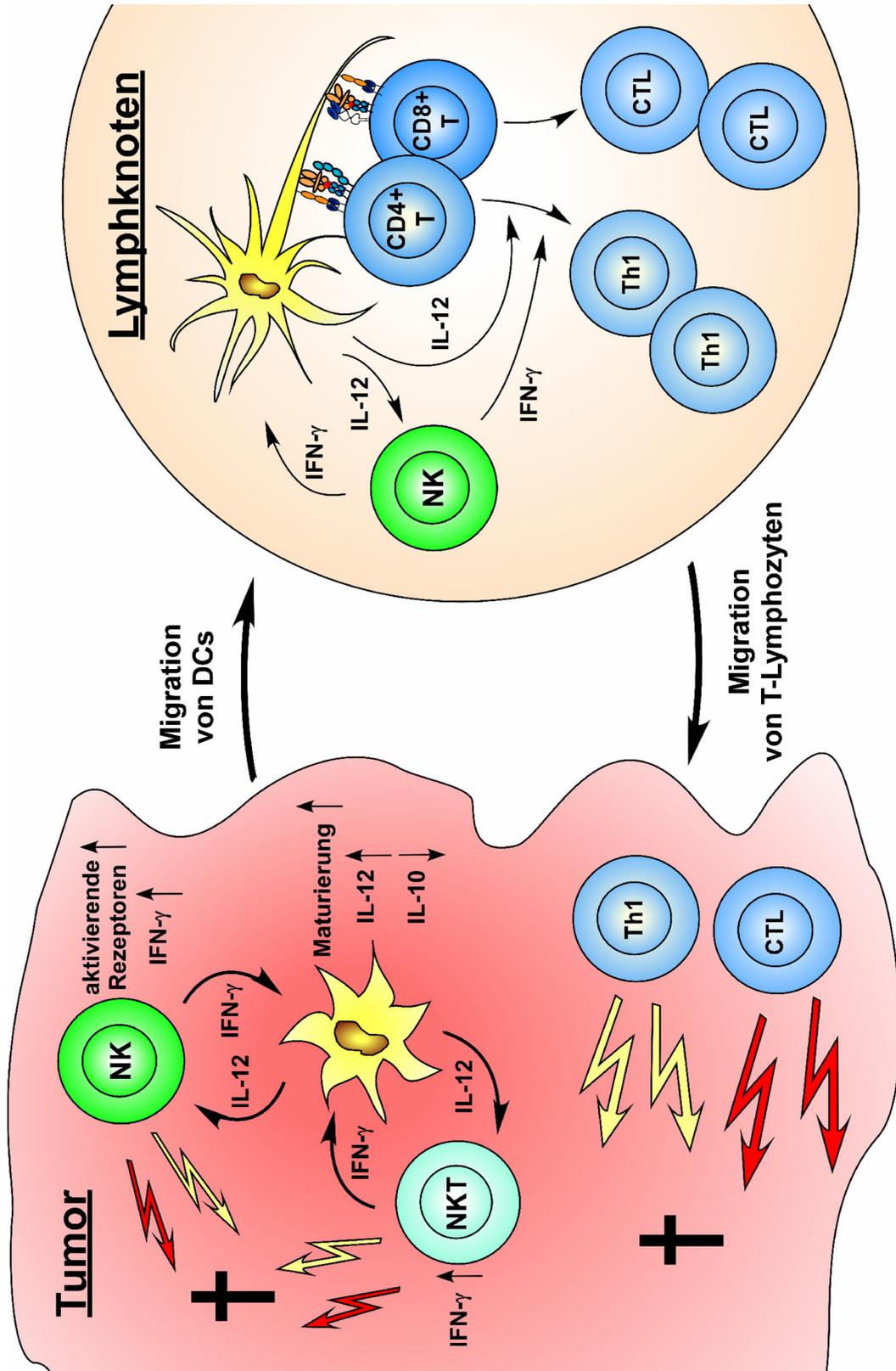
4.5 Bedeutung dendritischer Zellen bei der Immunabwehr von Tumoren

Die Ergebnisse dieser Arbeit zu den Wechselwirkungen von DCs und NK- bzw. NKT-Zellen können unter Berücksichtigung von Studien anderer Arbeitsgruppen in einem Modell für die antitumorale Immunantwort zusammengefasst werden (Abb. 38). DCs spielen eine zentrale Rolle bei der Induktion einer Immunreaktion gegen Tumoren. Sie entwickeln sich aus Stammzellen im Knochenmark und gelangen über den Blutweg in das Tumorgewebe (Banchereau *et al.*, 2005). Die Tumor-infiltrierenden unreifen DCs kennzeichnet die ausgeprägte Fähigkeit zur Aufnahme von Tumorantigenen in Form von Fragmenten apoptotischer oder nekrotischer Tumorzellen (Lee und Iwasaki 2007; Macagno *et al.*, 2007; Sabatté *et al.*, 2007). Die Generierung dieser Tumorzellfragmente wird in der frühen Phase einer antitumoralen Immunantwort von NK- und NKT-Zellen unterstützt, die bedeutende zytotoxische Effektorzellen des Immunsystems repräsentieren (Smyth *et al.*, 2002; Moretta *et al.*, 2005 B; O'Connor *et al.*, 2005; Fujii *et al.*, 2007). Immature DCs prozessieren die internalisierten Tumorfragmente und präsentieren die entstandenen Peptide in Komplexen mit MHC-Klasse II-Molekülen. Darüber hinaus können die exogenen Tumorproteine über den Mechanismus der Kreuzpräsentation als Peptide im Kontext mit MHC-Klasse I-Molekülen an die Zelloberfläche von DCs gelangen (Brode und Macary, 2004; Guermonprez und Amigorena, 2005). NK- und NKT-Zellen sind in der Lage, die Ausreifung und Aktivierung von DCs zu fördern. Dieser Prozess wird von Tumor-generierten Gefahrensignalen, wie Hitzeschockproteinen oder dem „high mobility group box“ (HMGB)-1-Protein und stimulierenden Zytokinen unterstützt (Whiteside und Odoux, 2004; Zeng *et al.*, 2006; Ghiringhelli *et al.*, 2007; Macagno *et al.*, 2007). Die aktivierten DCs produzieren proinflammatorische Zytokine, wie IL-12, welche die Zytotoxizität und die IFN- γ -Produktion von NK- und NKT-Zellen verstärken. IFN- γ erhöht die IL-12-Freisetzung von DCs, während es die Sekretion des immunsuppressiven Moleküls IL-10 hemmt. Das Zusammenspiel dieser Zytokine führt zu einer Amplifikation der immunmodulatorischen Signale und fördert die Lyse von Tumorzellen sowie die Ausbildung einer Entzündungsreaktion (Smyth *et al.*, 2002; Kalinski *et al.*, 2004; Münz *et al.*, 2005 B; Walzer *et al.*, 2005 A; Van Kaer, 2007). Die stimulierende Wirkung der löslichen Faktoren kann durch Interaktionen Zellmembran-assoziiierter Moleküle auf DCs und NK- bzw. NKT-Zellen unterstützt werden (Fernandez *et al.*, 1999; Ferlazzo *et al.*, 2002; Draghi *et al.*, 2007). Die ausgereiften DCs gelangen über das afferente Lymphgefäßsystem in den Parakortex der Lymphknoten. Dort sind sie durch die verstärkte Expression von MHC-Tumorpeptid-Komplexen, kostimulatorischen Molekülen

sowie Adhäsionsmolekülen charakterisiert (Angeli und Randolph, 2006). Deshalb besitzen mature DCs die außergewöhnliche Fähigkeit zur Aktivierung von Tumor-reaktiven CD8⁺ CTLs und CD4⁺ T-Lymphozyten. Aktivierte CD8⁺ CTLs kennzeichnet ihr ausgeprägtes zytotoxisches Potential gegenüber Tumorzellen. DCs fördern durch Sekretion von IL-12 die Differenzierung von CD4⁺ T-Lymphozyten in Th1-Zellen (Van der Merwe und Davis 2003; Schäkel *et al.*, 2006; Reiner, 2007). Diese Programmierung wird von NK-Zellen unterstützt, die sich ebenfalls im Lymphknoten befinden und nach Interaktionen mit DCs IFN- γ produzieren (Martín-Fontecha *et al.*, 2004; Bajénoff *et al.*, 2006; Morandi *et al.*, 2006). Th1-Lymphozyten fördern sowohl durch die Sekretion von IL-2 als auch durch eine Verstärkung der Antigenpräsentationsfähigkeit von DCs die Entwicklung von CD8⁺ CTLs. Aktivierte Th1-Zellen und Tumor-reaktive CD8⁺ CTLs gelangen ins Tumorgewebe und tragen durch Verstärkung der Entzündungsreaktion und direkte Lyse zur Zerstörung der Tumorzellen bei. Somit spielt die gegenseitige Aktivierung von DCs und NK- bzw. NKT-Zellen eine bedeutende Rolle bei der Elimination von Tumorzellen im Rahmen der Immunabwehr von Tumoren.

Abbildung 38: Die Bedeutung von DCs bei der Initiation einer antitumoralen Immunantwort.

Tumor-infiltrierende DCs nehmen Tumor-spezifische Antigene in Form von apoptotischen und nekrotischen Fragmenten auf. Diese werden von NK- und NKT-Zellen generiert, die Tumorzellen durch Apoptoseinduktion eliminieren. Darüber hinaus fördern NK- und NKT-Zellen die Maturierung und Aktivierung von DCs. Aktivierte DCs produzieren Zytokine, wie IL-12, welche die IFN- γ -Freisetzung und das zytotoxische Potential von NK- und NKT-Zellen fördern. IFN- γ verstärkt die IL-12-Produktion und inhibiert die IL-10-Sekretion der DCs. Die Amplifikation dieser Signale führt zu einer verstärkten Zytolyse der Tumorzellen (rote Pfeile) und zur Induktion einer frühen Entzündungsreaktion (gelbe Pfeile) durch NK- und NKT-Zellen. Die reifen DCs gelangen in die Lymphknoten, wo sie durch die hohe Expression von MHC-Tumorpeptid-Komplexen und kostimulatorischen Molekülen besonders effizient in der Lage sind, Tumor-reaktive CD8⁺ CTLs und CD4⁺ T-Lymphozyten zu induzieren. In den Lymphknoten interagieren DCs mit NK-Zellen, was zu einer verstärkten Sekretion von IL-12 und IFN- γ führt. Diese Zytokine fördern die Differenzierung der naiven CD4⁺ T-Lymphozyten in Th1-Zellen. Antigen-spezifische Th1-Zellen und Tumor-reaktive CD8⁺ CTLs gelangen in das Tumorgewebe und tragen durch die direkte Lyse und eine Verstärkung der Entzündungsreaktion zur Elimination der Tumorzellen bei.



5 Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DCs) sind als „professionelle“ Antigen-präsentierende Zellen besonders effizient in der Lage, Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. Die hohe Expression von MHC-Peptid-Komplexen und kostimulatorischen Molekülen befähigt DCs zur Induktion einer Antigen-spezifischen T-Zell-Antwort. Im Rahmen einer Immunreaktion gegen Tumorzellen sind DCs effektive Aktivatoren von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (CTLs), die Tumorzellen erkennen und eliminieren. Darüber hinaus stimulieren DCs CD4⁺ T-Lymphozyten und fördern deren Differenzierung in proinflammatorische T-Helfer-1-Lymphozyten. Diese herausragenden Eigenschaften prädestinieren DCs für eine immuntherapeutische Behandlung von Tumorpatienten.

In den letzten Jahren ergaben sich Hinweise, dass DCs auch zu einer Aktivierung von Natürlichen „Killer“ (NK)-Zellen in der Lage sind, die als zytotoxische Effektorzellen des angeborenen Immunsystems Tumorzellen eliminieren. Diese Erkenntnisse basieren hauptsächlich auf Untersuchungen mit murinen DCs oder artifiziellen humanen DCs, die aus CD14⁺ Monozyten oder CD34⁺ Stammzellen unter dem Einfluss verschiedener Zytokine über mehrere Tage generiert wurden. Somit reflektieren diese Studien nur bedingt die *in vivo*-Situation im Menschen. Aus diesem Grund bestand ein wesentliches Ziel dieser Arbeit in der Analyse der Wechselwirkungen zwischen nativen DCs und NK-Zellen. Dazu wurden slanDCs verwendet, welche die größte humane DC-Subpopulation des Blutes repräsentieren. SlanDCs wurden als wesentliche Produzenten von Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α und Interleukin (IL)-12 charakterisiert. Funktionelle Studien zeigten, dass slanDCs effektiv CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten aktivieren und nach Stimulation mit LPS zur Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Lymphozyten in proinflammatorische Th1-Zellen befähigt sind. Darüber hinaus sind slanDCs in der Lage, sowohl Antikörper-abhängig als auch Antikörper-unabhängig Tumorzellen zu lysieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst evaluiert, ob slanDCs eine effiziente Aktivierung von NK-Zellen bewirken. Als ein Ergebnis zeigte sich, dass Lipopolysaccharid (LPS)-stimulierte slanDCs sowohl zu einer verstärkten Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf der Oberfläche von NK-Zellen als auch zur Induktion der NK-Zell-Proliferation führen. Darüber hinaus wurde erstmals die slanDC-abhängige Erhöhung der Expression von aktivierenden Rezeptoren (NKp46, NKp44, NKp30) und Korezeptoren (2B4, DNAM-1) auf NK-Zellen demonstriert, welche essentiell für die NK-Zell-vermittelte Erkennung und Lyse von Tumorzellen sind. In weiteren Untersuchungen induzierten LPS-aktivierte slanDCs eine erhebliche Produktion von Interferon (IFN)- γ in NK-Zellen, welches proliferationshemmend auf Tumorzellen und aktivierend auf T-Lymphozyten wirkt.

Funktionelle Analysen ergaben, dass aktivierte slanDCs das zytotoxische Potential von NK-Zellen gegenüber der Tumorzelllinie K562 deutlich verstärken. Untersuchungen der zugrunde liegenden Mechanismen zeigten die herausragende Bedeutung von IL-12, das sowohl die Steigerung der IFN- γ -Sekretion als auch die Zunahme der zytolytischen Aktivität von NK-Zellen induzierte. Da NK-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Elimination von Tumorzellen bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) spielen, wurde der Einfluss von slanDCs auf das zytotoxische Potential von NK-Zellen gegenüber frisch etablierten AML-Blasten evaluiert. Dabei konnte erstmals gezeigt werden, dass LPS-aktivierte slanDCs die Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber AML-Blasten induzieren. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass stimulierte slanDCs zu einer effizienten Aktivierung von NK-Zellen in der Lage sind.

In weiteren Untersuchungen wurde evaluiert, ob NK-Zellen ihrerseits die immunstimulatorischen Eigenschaften von slanDCs beeinflussen. Die Analysen zeigten erstmals, dass unstimulierte NK-Zellen die Expression von MHC-Klasse II-Molekülen, kostimulatorischen Molekülen und Adhäsionsmolekülen auf slanDCs deutlich erhöhen. Somit fördern NK-Zellen die Maturierung von slanDCs, die für ihre Fähigkeit zur Aktivierung von CD8⁺ T-Lymphozyten sowie zur Induktion, Expansion und Differenzierung von CD4⁺ T-Helferzellen essentiell sind. NK-Zellen führen ebenfalls zu einer deutlichen Verstärkung der Produktion von IL-12 durch LPS-stimulierte slanDCs. Dieses Zytokin ist von zentraler Bedeutung bei der slanDC-vermittelten Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Lymphozyten in T-Helfer-1-Zellen und der Aktivierung von NK-Zellen. Darüber hinaus zeigte sich, dass NK-Zellen die Sekretion des immunsuppressiven Zytokins IL-10 durch LPS-stimulierte slanDCs reduzieren. In weiteren Analysen wurde demonstriert, dass die Interaktionen mit NK-Zellen die Fähigkeit von LPS-aktivierten slanDCs zur Programmierung naiver CD4⁺ T-Lymphozyten in IFN- γ -produzierende T-Helfer-1-Zellen deutlich verstärken. NK-Zellen stimulieren somit effizient die proinflammatorischen Eigenschaften von slanDCs.

NKT-Zellen repräsentieren eine weitere bedeutende Effektorzellpopulation der frühen antitumoralen Immunabwehr, die durch Sekretion von Zytokinen und ein ausgeprägtes zytolytisches Potential zur Elimination von Tumorzellen beiträgt. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals die Wechselwirkungen zwischen slanDCs und NKT-Zellen analysiert. Dabei verstärkten LPS-stimulierte slanDCs die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf NKT-Zellen. Darüber hinaus induzierten LPS-aktivierte slanDCs eine deutliche IFN- γ -Produktion in NKT-Zellen, wobei erneut die zentrale Rolle von IL-12 gezeigt wurde. Diese Ergebnisse demonstrierten, dass stimulierte slanDCs zu einer effektiven Aktivierung von NKT-Zellen in der Lage sind. In abschließenden Untersuchungen wurde die Wirkung von NKT-Zellen auf slanDCs evaluiert. Dabei

verstärkten NKT-Zellen die Maturierung von slanDCs erheblich und führten zu einer signifikanten Steigerung der IL-12-Produktion sowie zu einer Reduktion der IL-10-Freisetzung. In diesem Zusammenhang ergaben Analysen, dass NKT-Zell-produziertes IFN- γ wesentlich an der Modulation der Zytokinfreisetzung von slanDCs beteiligt war. Die gewonnenen Daten demonstrierten, dass NKT-Zellen und slanDCs zu einer gegenseitigen Aktivierung befähigt sind.

Die im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Erkenntnisse zu den Interaktionen von slanDCs und NK- bzw. NKT-Zellen können einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der Immunabwehr von Tumoren leisten und die Konzeption neuer antitumoraler Therapiestrategien unterstützen.

6 Literaturverzeichnis

Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology. Saunders 2003;Edition 5.

Acuto O, Michel F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol* 2003;3:939-951.

Adam C, King S, Allgeier T, Braumuller H, Luking C, Mysliwietz J, Kriegeskorte A, Busch DH, Rocken M, Mocikat R. DC-NK cell cross talk as a novel CD4+ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction. *Blood* 2005;106:338-344.

Aldemir H, Prod'homme V, Dumaurier MJ, Retiere C, Poupon G, Cazareth J, Bihl F, Braud VM. Cutting edge: lectin-like transcript 1 is a ligand for the CD161 receptor. *J Immunol* 2005;175:7791-7795.

Angeli V, Randolph GJ. Inflammation, lymphatic function, and dendritic cell migration. *Lymphat Res Biol* 2006;4:217-228.

Arnon TI, Markel G, Mandelboim O. Tumor and viral recognition by natural killer cells receptors. *Semin Cancer Biol* 2006;16:348-358.

Aversa F, Terenzi A, Tabilio A, Falzetti F, Carotti A, Ballanti S, Felicini R, Falcinelli F, Velardi A, Ruggeri L, Aloisi T, Saab JP, Santucci A, Perruccio K, Martelli MP, Mecucci C, Reisner Y, Martelli MF. Full haplotype-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse. *J Clin Oncol* 2005;23:3447-3454.

Bajénoff M, Breart B, Huang AY, Qi H, Cazareth J, Braud VM, Germain RN, Glaichenhaus N. Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. *J Exp Med* 2006;203:619-631.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811.

Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 2005;5:296-306.

Barchet W, Cella M, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells--virus experts of innate immunity. *Semin Immunol* 2005;17:253-261.

Barfoed AM, Petersen TR, Kirkin AF, Thor SP, Claesson MH, Zeuthen J. Cytotoxic T-lymphocyte clones, established by stimulation with the HLA-A2 binding p5365-73 wild type peptide loaded on dendritic cells In vitro, specifically recognize and lyse HLA-A2 tumour cells overexpressing the p53 protein. *Scand J Immunol* 2000;51:128-133.

Barral DC, Brenner MB. CD1 antigen presentation: how it works. *Nat Rev Immunol* 2007;7:929-941.

Beelen DW, Ottinger HD, Ferencik S, Elmaagacli AH, Peceny R, Trenscher R, Grosse-Wilde H. Genotypic inhibitory killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility enhances the long-term antileukemic effect of unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with myeloid leukemias. *Blood* 2005;105:2594-2600.

Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* 2007;7:875-888.

Borg C, Jalil A, Laderach D, Maruyama K, Wakasugi H, Charrier S, Ryffel B, Cambi A, Figdor C, Vainchenker W, Galy A, Caignard A, Zitvogel L. NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. *Blood* 2004;104:3267-3275.

Bottino C, Moretta L, Moretta A. NK cell activating receptors and tumor recognition in humans. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;298:175-182.

Boyiadzis M, Foon KA. Natural killer cells: from bench to cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2006;6:967-970.

Boyman O, Purton JF, Surh CD, Sprent J. Cytokines and T-cell homeostasis. *Curr Opin Immunol* 2007;19:320-326.

Brigl M, Bry L, Kent SC, Gumperz JE, Brenner MB. Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat Immunol* 2003;4:1230-1237.

Brode S, Macary PA. Cross-presentation: dendritic cells and macrophages bite off more than they can chew! *Immunology* 2004;112:345-351.

Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev* 2006;214:73-91. A

Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 2006;107:159-166. B

Carbone E, Terrazzano G, Ruggiero G, Zanzi D, Ottaiano A, Manzo C, Karre K, Zappacosta S. Recognition of autologous dendritic cells by human NK cells. *Eur J Immunol* 1999;29:4022-4029.

Castriconi R, Cantoni C, Della Chiesa M, Vitale M, Marcenaro E, Conte R, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:4120-4125.

Chung Y, Qin H, Kang CY, Kim S, Kwak LW, Dong C. An NKT-mediated autologous vaccine generates CD4 T-cell dependent potent antilymphoma immunity. *Blood* 2007;110:2013-2019.

Colonna M, Pulendran B, Iwasaki A. Dendritic cells at the host-pathogen interface. *Nat Immunol* 2006;7:117-120.

Conti P, Kempuraj D, Kandere K, Di GM, Barbacane RC, Castellani ML, Felaco M, Boucher W, Letourneau R, Theoharides TC. IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. *Immunol Lett* 2003;86:123-129.

Crowe NY, Coquet JM, Berzins SP, Kyparissoudis K, Keating R, Pellicci DG, Hayakawa Y, Godfrey DI, Smyth MJ. Differential antitumor immunity mediated by NKT cell subsets in vivo. *J Exp Med* 2005;202:1279-1288.

Davis ID, Jefford M, Parente P, Cebon J. Rational approaches to human cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol* 2003;73:3-29.

de Jong EC, Smits HH, Kapsenberg ML. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol* 2005;26:289-307.

Della Chiesa M, Romagnani C, Thiel A, Moretta L, Moretta A. Multidirectional interactions are bridging human NK cells with plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells during innate immune responses. *Blood* 2006;108:3851-3858.

Di Santo JP. Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annu Rev Immunol* 2006;24:257-286.

Draghi M, Pashine A, Sanjanwala B, Gendzekhadze K, Cantoni C, Cosman D, Moretta A, Valiante NM, Parham P. NKp46 and NKG2D recognition of infected dendritic cells is necessary for NK cell activation in the human response to influenza infection. *J Immunol* 2007;178:2688-2698.

Dustin ML, Tseng SY, Varma R, Campi G. T cell-dendritic cell immunological synapses. *Curr Opin Immunol* 2006;18:512-516.

Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 2002;100:1935-1947.

Farag SS, Caligiuri MA. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev* 2006;20:123-137.

Fauriat C, Just-Landi S, Mallet F, Arnoulet C, Sainty D, Olive D, Costello RT. Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: Evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction. *Blood* 2007;109:323-330.

Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Münz C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 2002;195:343-351.

Ferlazzo G, Morandi B, D'Agostino A, Meazza R, Melioli G, Moretta A, Moretta L. The interaction between NK cells and dendritic cells in bacterial infections results in rapid induction of NK cell activation and in the lysis of uninfected dendritic cells. *Eur J Immunol* 2003;33:306-313.

Ferlazzo G, Pack M, Thomas D, Paludan C, Schmid D, Strowig T, Bougras G, Muller WA, Moretta L, Münz C. Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:16606-16611.

Ferlazzo G, Münz C. NK cell compartments and their activation by dendritic cells. *J Immunol* 2004;172:1333-1339.

Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, Suter M, Perricaudet M, Tursz T, Maraskovsky E, Zitvogel L. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med* 1999;5:405-411.

Figdor CG, de V, I, Lesterhuis WJ, Melief CJ. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med* 2004;10:475-480.

Frasca L, Nasso M, Spensieri F, Fedele G, Palazzo R, Malavasi F, Ausiello CM. IFN-gamma arms human dendritic cells to perform multiple effector functions. *J Immunol* 2008;180:1471-1481.

Fuchsberger M, Hochrein H, O'Keeffe M. Activation of plasmacytoid dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 2005;83:571-577.

Fujii S, Shimizu K, Kronenberg M, Steinman RM. Prolonged IFN-gamma-producing NKT response induced with alpha-galactosylceramide-loaded DCs. *Nat Immunol* 2002;3:867-874.

Fujii S, Shimizu K, Hemmi H, Steinman RM. Innate Valpha14(+) natural killer T cells mature dendritic cells, leading to strong adaptive immunity. *Immunol Rev* 2007;220:183-198.

Gasser S, Raulet DH. Activation and self-tolerance of natural killer cells. *Immunol Rev* 2006;214:130-142.

Gerosa F, Gobbi A, Zorzi P, Burg S, Briere F, Carra G, Trinchieri G. The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J Immunol* 2005;174:727-734.

Ghiringhelli F, Apetoh L, Housseau F, Kroemer G, Zitvogel L. Links between innate and cognate tumor immunity. *Curr Opin Immunol* 2007;19:224-231.

Giaccone G, Punt CJ, Ando Y, Ruijter R, Nishi N, Peters M, von Blomberg BM, Scheper RJ, van d, V, van den Eertwegh AJ, Roelvink M, Beijnen J, Zwierzina H, Pinedo HM. A phase I study of the natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* 2002;8:3702-3709.

Gilboa E. DC-based cancer vaccines. *J Clin Invest* 2007;117:1195-1203.

Godfrey DI, Berzins SP. Control points in NKT-cell development. *Nat Rev Immunol* 2007;7:505-518.

Guermontprez P, Amigorena S. Pathways for antigen cross presentation. *Springer Semin Immunopathol* 2005;26:257-271.

Hanabuchi S, Watanabe N, Wang YH, Wang YH, Ito T, Shaw J, Cao W, Qin FX, Liu YJ. Human plasmacytoid predendritic cells activate NK cells through glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-ligand (GITRL). *Blood* 2006;107:3617-3623.

Hébert E. Endogenous lectins as cell surface transducers. *Biosci Rep* 2000;20:213-237.

Hermans IF, Silk JD, Gileadi U, Salio M, Mathew B, Ritter G, Schmidt R, Harris AL, Old L, Cerundolo V. NKT cells enhance CD4+ and CD8+ T cell responses to soluble antigen in vivo through direct interaction with dendritic cells. *J Immunol* 2003;171:5140-5147.

Hermans IF, Silk JD, Gileadi U, Masri SH, Shepherd D, Farrand KJ, Salio M, Cerundolo V. Dendritic cell function can be modulated through cooperative actions of TLR ligands and invariant NKT cells. *J Immunol* 2007;178:2721-2729.

Höpken UE, Lehmann I, Droese J, Lipp M, Schuler T, Rehm A. The ratio between dendritic cells and T cells determines the outcome of their encounter: proliferation versus deletion. *Eur J Immunol* 2005;35:2851-2863.

Howell WM, Rose-Zerilli MJ. Interleukin-10 polymorphisms, cancer susceptibility and prognosis. *Fam Cancer* 2006;5:143-149.

Iannello A, Ahmad A. Role of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in the efficacy of therapeutic anti-cancer monoclonal antibodies. *Cancer Metastasis Rev* 2005;24:487-499.

Janeway CA, Traver P, Walport M, Shlomchik M. *Immunology – the immune system in health and disease* Garland Science 2005;Edition 6.

Jinushi M, Takehara T, Kanto T, Tatsumi T, Groh V, Spies T, Miyagi T, Suzuki T, Sasaki Y, Hayashi N. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN- α -stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2003;170:1249-1256.

Jukes JP, Wood KJ, Jones ND. Natural killer T cells: a bridge to tolerance or a pathway to rejection? *Transplantation* 2007;84:679-681.

Kadowaki N. Dendritic cells: a conductor of T cell differentiation. *Allergol Int* 2007;56:193-199.

Kalinski P, Giermasz A, Nakamura Y, Basse P, Storkus WJ, Kirkwood JM, Mailliard RB. Helper role of NK cells during the induction of anticancer responses by dendritic cells. *Mol Immunol* 2005;42:535-539.

Kitamura H, Iwakabe K, Yahata T, Nishimura S, Ohta A, Ohmi Y, Sato M, Takeda K, Okumura K, Van KL, Kawano T, Taniguchi M, Nishimura T. The natural killer T (NKT) cell ligand alpha-galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. *J Exp Med* 1999;189:1121-1128.

Kronenberg M. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol* 2005;23:877-900.

Lee HK, Iwasaki A. Innate control of adaptive immunity: dendritic cells and beyond. *Semin Immunol* 2007;19:48-55.

Leibson PJ. Signal transduction during natural killer cell activation: inside the mind of a killer. *Immunity* 1997;6:655-661.

Lin H, Nieda M, Nicol AJ. Differential proliferative response of NKT cell subpopulations to in vitro stimulation in presence of different cytokines. *Eur J Immunol* 2004;34:2664-2671.

Lin H, Nieda M, Hutton JF, Rozenkov V, Nicol AJ. Comparative gene expression analysis of NKT cell subpopulations. *J Leukoc Biol* 2006;80:164-173.

Lindstedt M, Lundberg K, Borrebaeck CA. Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells. *J Immunol* 2005;175:4839-4846.

Liu K, Idoyaga J, Charalambous A, Fujii S, Bonito A, Mordoh J, Wainstok R, Bai XF, Liu Y, Steinman RM. Innate NKT lymphocytes confer superior adaptive immunity via tumor-capturing dendritic cells. *J Exp Med* 2005;202:1507-1516.

Ljunggren HG, Malmberg KJ. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol* 2007;7:329-339.

Macagno A, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation. *Trends Immunol* 2007;28:227-233.

MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DN. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 2002;100:4512-4520.

Mailliard RB, Son YI, Redlinger R, Coates PT, Giermasz A, Morel PA, Storkus WJ, Kalinski P. Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: two-signal requirement for the induction of NK cell helper function. *J Immunol* 2003;171:2366-2373.

Marcenaro E, Della Chiesa M, Bellora F, Parolini S, Millo R, Moretta L, Moretta A. IL-12 or IL-4 prime human NK cells to mediate functionally divergent interactions with dendritic cells or tumors. *J Immunol* 2005;174:3992-3998.

Marcenaro E, Dondero A, Moretta A. Multi-directional cross-regulation of NK cell function during innate immune responses. *Transpl Immunol* 2006;17:16-19.

Marschner A, Rothenfusser S, Hornung V, Prell D, Krug A, Kerkmann M, Wellisch D, Poeck H, Greinacher A, Giese T, Endres S, Hartmann G. CpG ODN enhance antigen-specific NKT cell activation via plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2005;35:2347-2357.

Marshall JD, Heeke DS, Abbate C, Yee P, Van NG. Induction of interferon-gamma from natural killer cells by immunostimulatory CpG DNA is mediated through plasmacytoid-dendritic-cell-produced interferon-alpha and tumour necrosis factor-alpha. *Immunology* 2006;117:38-46.

Martín-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 2004;5:1260-1265.

Marzio R, Mauer J, Betz-Corradin S. CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1999;21:565-582.

Mattarollo SR, Kenna T, Nieda M, Nicol AJ. Chemotherapy pretreatment sensitizes solid tumor-derived cell lines to V alpha 24+ NKT cell-mediated cytotoxicity. *Int J Cancer* 2006;119:1630-1637.

Mempel TR, Henrickson SE, von Andrian UH. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 2004;427:154-159.

Mercer JC, Ragin MJ, August A. Natural killer T cells: rapid responders controlling immunity and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:1337-1343.

Miller JS, Soignier Y, Panoskaltsis-Mortari A, McNearney SA, Yun GH, Fautsch SK, McKenna D, Le C, Defor TE, Burns LJ, Orchard PJ, Blazar BR, Wagner JE, Slungaard A, Weisdorf DJ, Okazaki IJ, McGlave PB. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* 2005;105:3051-3057.

- Minami K, Yanagawa Y, Iwabuchi K, Shinohara N, Harabayashi T, Nonomura K, Onoe K. Negative feedback regulation of T helper type 1 (Th1)/Th2 cytokine balance via dendritic cell and natural killer T cell interactions. *Blood* 2005;106:1685-1693.
- Mocikat R, Braumuller H, Gumy A, Egeter O, Ziegler H, Reusch U, Bubeck A, Louis J, Mailhammer R, Riethmuller G, Koszinowski U, Rocken M. Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity* 2003;19:561-569.
- Montoya CJ, Jie HB, Al-Harhi L, Mulder C, Patino PJ, Rugeles MT, Krieg AM, Landay AL, Wilson SB. Activation of plasmacytoid dendritic cells with TLR9 agonists initiates invariant NKT cell-mediated cross-talk with myeloid dendritic cells. *J Immunol* 2006;177:1028-1039.
- Morandi B, Bougras G, Muller WA, Ferlazzo G, Münz C. NK cells of human secondary lymphoid tissues enhance T cell polarization via IFN-gamma secretion. *Eur J Immunol* 2006;36:2394-2400.
- Moretta A, Marcenaro E, Sivori S, Della Chiesa M, Vitale M, Moretta L. Early liaisons between cells of the innate immune system in inflamed peripheral tissues. *Trends Immunol* 2005;26:668-675. A
- Moretta A. The dialogue between human natural killer cells and dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 2005;17:306-311.
- Moretta L, Bottino C, Pende D, Vitale M, Mingari MC, Moretta A. Human natural killer cells: Molecular mechanisms controlling NK cell activation and tumor cell lysis. *Immunol Lett* 2005;100:7-13. B
- Moretta L, Ferlazzo G, Bottino C, Vitale M, Pende D, Mingari MC, Moretta A. Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions. *Immunol Rev* 2006;214:219-228.
- Münz C, Dao T, Ferlazzo G, de Cos MA, Goodman K, Young JW. Mature myeloid dendritic cell subsets have distinct roles for activation and viability of circulating human natural killer cells. *Blood* 2005;105:266-273. A
- Münz C, Steinman RM, Fujii S. Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 2005;202:203-207. B
- Nagarajan NA, Kronenberg M. Invariant NKT cells amplify the innate immune response to lipopolysaccharide. *J Immunol* 2007;178:2706-2713.

Nair SK, Heiser A, Boczkowski D, Majumdar A, Naoe M, Lebkowski JS, Vieweg J, Gilboa E. Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells. *Nat Med* 2000;6:1011-1017.

Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998;4:328-332.

Nieda M, Okai M, Tazbirkova A, Lin H, Yamaura A, Ide K, Abraham R, Juji T, Macfarlane DJ, Nicol AJ. Therapeutic activation of V α 24+V β 11+ NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity. *Blood* 2004;103:383-389.

O'Connor GM, Hart OM, Gardiner CM. Putting the natural killer cell in its place. *Immunology* 2006;117:1-10.

Pende D, Spaggiari GM, Marcenaro S, Martini S, Rivera P, Capobianco A, Falco M, Lanino E, Pierri I, Zambello R, Bacigalupo A, Mingari MC, Moretta A, Moretta L. Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood* 2005;105:2066-2073.

Pende D, Castriconi R, Romagnani P, Spaggiari GM, Marcenaro S, Dondero A, Lazzeri E, Lasagni L, Martini S, Rivera P, Capobianco A, Moretta L, Moretta A, Bottino C. Expression of the DNAM-1 ligands, Nectin-2 (CD112) and poliovirus receptor (CD155), on dendritic cells: relevance for natural killer-dendritic cell interaction. *Blood* 2006;107:2030-2036.

Piccioli D, Sbrana S, Melandri E, Valiante NM. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* 2002;195:335-341.

Piccioli D, Tavarini S, Borgogni E, Steri V, Nuti S, Sammicheli C, Bardelli M, Montagna D, Locatelli F, Wack A. Functional specialization of human circulating CD16 and CD1c myeloid dendritic-cell subsets. *Blood* 2007;109:5371-5379.

Pulendran B. Variagation of the immune response with dendritic cells and pathogen recognition receptors. *J Immunol* 2005;174:2457-2465.

Qin Z, Blankenstein T. CD4+ T cell--mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity* 2000;12:677-686.

Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Angeli V. Factors and signals that govern the migration of dendritic cells via lymphatics: recent advances. *Springer Semin Immunopathol* 2005;26:273-287.

Raulet DH. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat Immunol* 2004;5:996-1002.

Reiner SL. Development in motion: helper T cells at work. *Cell* 2007;129:33-36.

Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal MR, Liu YJ. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999;283:1183-1186.

Romagnani C, Della Chiesa M, Kohler S, Moewes B, Radbruch A, Moretta L, Moretta A, Thiel A. Activation of human NK cells by plasmacytoid dendritic cells and its modulation by CD4⁺ T helper cells and CD4⁺ CD25^{hi} T regulatory cells. *Eur J Immunol* 2005;35:2452-2458.

Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 2004;10:909-915.

Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002;295:2097-2100.

Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, Martelli MF, Velardi A. Exploitation of alloreactive NK cells in adoptive immunotherapy of cancer. *Curr Opin Immunol* 2005;17:211-217.

Ruggeri L, Mancusi A, Burchielli E, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Natural killer cell alloreactivity in allogeneic hematopoietic transplantation. *Curr Opin Oncol* 2007;19:142-147. A

Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, Urbani E, Carotti A, Aloisi T, Stern M, Pende D, Perruccio K, Burchielli E, Topini F, Bianchi E, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood* 2007;110:433-440. B

Ruggeri L, Mancusi A, Burchielli E, Capanni M, Carotti A, Aloisi T, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. NK cell alloreactivity and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis* 2008;40:84-90.

Rutella S, Danese S, Leone G. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood* 2006;108:1435-1440.

Sabatté J, Maggini J, Nahmod K, Amaral MM, Martinez D, Salamone G, Ceballos A, Giordano M, Vermeulen M, Geffner J. Interplay of pathogens, cytokines and other stress signals in the regulation of dendritic cell function. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007;18:5-17.

Saito Y, Yanagawa Y, Kikuchi K, Iijima N, Iwabuchi K, Onoe K. Low-dose lipopolysaccharide modifies the production of IL-12 by dendritic cells in response to various cytokines. *J Clin Exp Hematop* 2006;46:31-36.

Sallusto F, Lanzavecchia A. The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis Res* 2002;4 Suppl 3:S127-S132.

Sato K, Fujita S. Dendritic Cells-Nature and Classification. *Allergol Int* 2007;56:

Schäkel K, Mayer E, Federle C, Schmitz M, Riethmuller G, Rieber EP. A novel dendritic cell population in human blood: one-step immunomagnetic isolation by a specific mAb (M-DC8) and in vitro priming of cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1998;28:4084-4093.

Schäkel K, Kannagi R, Kniep B, Goto Y, Mitsuoka C, Zwirner J, Soruri A, von KM, Rieber E. 6-Sulfo LacNAc, a novel carbohydrate modification of PSGL-1, defines an inflammatory type of human dendritic cells. *Immunity* 2002;17:289-301.

Schäkel K, von KM, Hansel A, Ebling A, Schulze L, Haase M, Semmler C, Sarfati M, Barclay AN, Randolph GJ, Meurer M, Rieber EP. Human 6-sulfo LacNAc-expressing dendritic cells are principal producers of early interleukin-12 and are controlled by erythrocytes. *Immunity* 2006;24:767-777.

Schmitz M, Zhao S, Schäkel K, Bornhauser M, Ockert D, Rieber EP. Native human blood dendritic cells as potent effectors in antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Blood* 2002;100:1502-1504.

Schmitz M, Zhao S, Deuse Y, Schäkel K, Wehner R, Wohner H, Holig K, Wienforth F, Kiessling A, Bornhauser M, Temme A, Rieger MA, Weigle B, Bachmann M, Rieber EP. Tumoricidal potential of native blood dendritic cells: direct tumor cell killing and activation of NK cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 2005;174:4127-4134.

Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* 2007;96:41-101.

Schotte R, Risoan MC, driss-Vermare N, Bridon JM, Duhon T, Weijer K, Briere F, Spits H. The transcription factor Spi-B is expressed in plasmacytoid DC precursors and inhibits T-, B-, and NK-cell development. *Blood* 2003;101:1015-1023.

Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004;75:163-189.

Schuler G, Schuler-Thurner B, Steinman RM. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 2003;15:138-147.

Seino K, Motohashi S, Fujisawa T, Nakayama T, Taniguchi M. Natural killer T cell-mediated antitumor immune responses and their clinical applications. *Cancer Sci* 2006;97:807-812.

Semino C, Angelini G, Poggi A, Rubartelli A. NK/iDC interaction results in IL-18 secretion by DCs at the synaptic cleft followed by NK cell activation and release of the DC maturation factor HMGB1. *Blood* 2005;106:609-616.

Sentman CL, Barber MA, Barber A, Zhang T. NK cell receptors as tools in cancer immunotherapy. *Adv Cancer Res* 2006;95:249-292.

Shilling HG, Young N, Guethlein LA, Cheng NW, Gardiner CM, Tyan D, Parham P. Genetic control of human NK cell repertoire. *J Immunol* 2002;169:239-247.

Shimizu K, Kurosawa Y, Taniguchi M, Steinman RM, Fujii S. Cross-presentation of glycolipid from tumor cells loaded with alpha-galactosylceramide leads to potent and long-lived T cell mediated immunity via dendritic cells. *J Exp Med* 2007;204:2641-2653.

Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002;2:151-161.

Siegler U, Kalberer CP, Nowbakht P, Sendelov S, Meyer-Monard S, Wodnar-Filipowicz A. Activated natural killer cells from patients with acute myeloid leukemia are cytotoxic against autologous leukemic blasts in NOD/SCID mice. *Leukemia* 2005;19:2215-2222.

Slingluff CL, Jr., Petroni GR, Yamshchikov GV, Barnd DL, Eastham S, Galavotti H, Patterson JW, Deacon DH, Hibbitts S, Teates D, Neese PY, Grosh WW, Chianese-Bullock KA, Woodson EM, Wiernasz CJ, Merrill P, Gibson J, Ross M, Engelhard VH. Clinical and immunologic results of a randomized phase II trial of vaccination using four melanoma peptides either administered in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in adjuvant or pulsed on dendritic cells. *J Clin Oncol* 2003;21:4016-4026.

Smyth MJ, Thia KY, Street SE, Cretney E, Trapani JA, Taniguchi M, Kawano T, Pelikan SB, Crowe NY, Godfrey DI. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med* 2000;191:661-668.

Smyth MJ, Crowe NY, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, Godfrey DI. NKT cells - conductors of tumor immunity? *Curr Opin Immunol* 2002;14:165-171.

Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, Takeda K, van Dommelen SL, gli-Esposti MA, Hayakawa Y. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 2005;42:501-510.

Snijders A, Kalinski P, Hilkens CM, Kapsenberg ML. High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *Int Immunol* 1998;10:1593-1598.

Solana R, Casado JG, Delgado E, DelaRosa O, Marin J, Duran E, Pawelec G, Tarazona R. Lymphocyte activation in response to melanoma: interaction of NK-associated receptors and their ligands. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56:101-109.

Song W, Kong HL, Carpenter H, Torii H, Granstein R, Rafii S, Moore MA, Crystal RG. Dendritic cells genetically modified with an adenovirus vector encoding the cDNA for a model antigen induce protective and therapeutic antitumor immunity. *J Exp Med* 1997;186:1247-1256.

Soumelis V, Liu YJ. From plasmacytoid to dendritic cell: morphological and functional switches during plasmacytoid pre-dendritic cell differentiation. *Eur J Immunol* 2006;36:2286-2292.

Steinman RM, Hemmi H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;311:17-58.

Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 2007;449:419-426.

Steinman RM. Dendritic cells: understanding immunogenicity. *Eur J Immunol* 2007;37 Suppl 1:S53-S60.

Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol* 2007;19:281-286.

Straube C, Wehner R, Wendisch M, Bornhauser M, Bachmann M, Rieber EP, Schmitz M. Bortezomib significantly impairs the immunostimulatory capacity of human myeloid blood dendritic cells. *Leukemia* 2007;

- Stronge VS, Salio M, Jones EY, Cerundolo V. A closer look at CD1d molecules: new horizons in studying NKT cells. *Trends Immunol* 2007;28:455-462.
- Sulica A, Morel P, Metes D, Herberman RB. Ig-binding receptors on human NK cells as effector and regulatory surface molecules. *Int Rev Immunol* 2001;20:371-414.
- Tacke PJ, de V, I, Torensma R, Figdor CG. Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nat Rev Immunol* 2007;7:790-802.
- Takeuchi S, Furue M. Dendritic cells: ontogeny. *Allergol Int* 2007;56:215-223.
- Teng MW, Westwood JA, Darcy PK, Sharkey J, Tsuji M, Franck RW, Porcelli SA, Besra GS, Takeda K, Yagita H, Kershaw MH, Smyth MJ. Combined natural killer T-cell based immunotherapy eradicates established tumors in mice. *Cancer Res* 2007;67:7495-7504.
- Terabe M, Berzofsky JA. NKT cells in immunoregulation of tumor immunity: a new immunoregulatory axis. *Trends Immunol* 2007;28:491-496.
- Turner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den DP, Brocker EB, Steinman RM, Enk A, Kampgen E, Schuler G. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* 1999;190:1669-1678.
- Toura I, Kawano T, Akutsu Y, Nakayama T, Ochiai T, Taniguchi M. Cutting edge: inhibition of experimental tumor metastasis by dendritic cells pulsed with alpha-galactosylceramide. *J Immunol* 1999;163:2387-2391.
- Tuyaerts S, Aerts JL, Corthals J, Neyns B, Heirman C, Breckpot K, Thielemans K, Bonehill A. Current approaches in dendritic cell generation and future implications for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56:1513-1537.
- Uchida T, Horiguchi S, Tanaka Y, Yamamoto H, Kunii N, Motohashi S, Taniguchi M, Nakayama T, Okamoto Y. Phase I study of alpha-galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells administration to the nasal submucosa in unresectable or recurrent head and neck cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2008;57:337-345.
- Ueno H, Klechevsky E, Morita R, Asford C, Cao T, Matsui T, Di PT, Connolly J, Fay JW, Pascual V, Palucka AK, Banchereau J. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev* 2007;219:118-142.

Van der Merwe PA, Davis SJ. Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. *Annu Rev Immunol* 2003;21:659-684.

Van Vliet SJ, den DJ, Gringhuis SI, Geijtenbeek TB, van KY. Innate signaling and regulation of Dendritic cell immunity. *Curr Opin Immunol* 2007;19:435-440.

Van Kaer L, Joyce S. Innate immunity: NKT cells in the spotlight. *Curr Biol* 2005;15:R429-R431.

Van Kaer L. NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions. *Curr Opin Immunol* 2007;19:354-364.

Verheyden S, Demanet C. NK cell receptors and their ligands in leukemia. *Leukemia* 2007;

Villadangos JA, Schnorrer P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol* 2007;7:543-555.

Vitale M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Romagnani C, Thiel A, Moretta L, Moretta A. The small subset of CD56bright. *Eur J Immunol* 2004;34:1715-1722.

Vitale M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Pende D, Arico M, Moretta L, Moretta A. NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood* 2005;106:566-571.

Wada H, Matsumoto N, Maenaka K, Suzuki K, Yamamoto K. The inhibitory NK cell receptor CD94/NKG2A and the activating receptor CD94/NKG2C bind the top of HLA-E through mostly shared but partly distinct sets of HLA-E residues. *Eur J Immunol* 2004;34:81-90.

Walzer T, Dalod M, Vivier E, Zitvogel L. Natural killer cell-dendritic cell crosstalk in the initiation of immune responses. *Expert Opin Biol Ther* 2005;5 Suppl 1:S49-S59. A

Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* 2005;106:2252-2258. B

Watanabe N, Hanabuchi S, Marloie-Provost MA, Antonenko S, Liu YJ, Soumelis V. Human TSLP promotes CD40 ligand-induced IL-12 production by myeloid dendritic cells but maintains their Th2 priming potential. *Blood* 2005;105:4749-4751.

Wehner R, Wendisch M, Schäkel K, Bornhauser M, Platzbecker U, Mohr B, Temme A, Bachmann M, Rieber EP, Schmitz M. Imatinib mesylate does not impair the immunogenicity of human myeloid blood dendritic cells. *Leukemia* 2006;20:1629-1632.

Whiteside TL, Odoux C. Dendritic cell biology and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53:240-248.

Wierecky J, Muller MR, Wirths S, Halder-Oehler E, Dorfel D, Schmidt SM, Hantschel M, Brugger W, Schroder S, Horger MS, Kanz L, Brossart P. Immunologic and clinical responses after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells in metastatic renal cancer patients. *Cancer Res* 2006;66:5910-5918.

Williams LM, Ricchetti G, Sarma U, Smallie T, Foxwell BM. Interleukin-10 suppression of myeloid cell activation--a continuing puzzle. *Immunology* 2004;113:281-292.

Wilson NS, Villadangos JA. Regulation of antigen presentation and cross-presentation in the dendritic cell network: facts, hypothesis, and immunological implications. *Adv Immunol* 2005;86:241-305.

Woan K, Reddy V. Potential therapeutic role of natural killer cells in cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2007;7:17-29.

Wu L, Liu YJ. Development of dendritic-cell lineages. *Immunity* 2007;26:741-750.

Yang YF, Tomura M, Ono S, Hamaoka T, Fujiwara H. Requirement for IFN-gamma in IL-12 production induced by collaboration between v(alpha)14(+) NKT cells and antigen-presenting cells. *Int Immunol* 2000;12:1669-1675.

Young HA, Bream JH. IFN-gamma: recent advances in understanding regulation of expression, biological functions, and clinical applications. *Curr Top Microbiol Immunol* 2007;316:97-117.

Zamai L, Ponti C, Mirandola P, Gobbi G, Papa S, Galeotti L, Cocco L, Vitale M. NK cells and cancer. *J Immunol* 2007;178:4011-4016.

Zanoni I, Granucci F, Foti M, Ricciardi-Castagnoli P. Self-tolerance, dendritic cell (DC)-mediated activation and tissue distribution of natural killer (NK) cells. *Immunol Lett* 2007;110:6-17.

Zeng Y, Chen X, Larmonier N, Larmonier C, Li G, Sepassi M, Marron M, Andreansky S, Katsanis E. Natural killer cells play a key role in the antitumor immunity generated by chaperone-rich cell lysate vaccination. *Int J Cancer* 2006;119:2624-2631.

Zhang Q, Chen G, Liu X, Qian Q. Monoclonal antibodies as therapeutic agents in oncology and antibody gene therapy. *Cell Res* 2007;17:89-99.

Zhang Z, Wang FS. Plasmacytoid dendritic cells act as the most competent cell type in linking antiviral innate and adaptive immune responses. *Cell Mol Immunol* 2005;2:411-417.

Zitvogel L, Mayordomo JI, Tjandrawan T, DeLeo AB, Clarke MR, Lotze MT, Storkus WJ. Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *J Exp Med* 1996;183:87-97.

Zitvogel L, Terme M, Borg C, Trinchieri G. Dendritic cell-NK cell cross-talk: regulation and physiopathology. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;298:157-174.

Zou GM, Tam YK. Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances. *Eur Cytokine Netw* 2002;13:186-199.

Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006;6:295-307.

Zwirner NW, Fuertes MB, Girart MV, Domaica CI, Rossi LE. Cytokine-driven regulation of NK cell functions in tumor immunity: role of the MICA-NKG2D system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007;18:159-170.

Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Immunologie der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn PD Dr. med. M. Schmitz angefertigt.

Die Promotionsordnung wird anerkannt.

Dresden, den

Rebekka Wehner

Danksagung

Für die spannende Aufgabenstellung dieser Arbeit und die ausgezeichnete Unterstützung danke ich Herrn PD Dr. med. M. Schmitz in ganz besonderem Maße. Sein außergewöhnliches Fachwissen, sein Engagement und seine äußerst kompetente Begleitung prägten mein wissenschaftliches Verständnis und waren sehr wertvoll für mich.

Herrn Prof. Dr. G. Vollmer möchte ich für die Mitbetreuung der Arbeit und die Erstellung des Erstgutachtens vielmals danken.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Dipl.-Math. E. Kuhlisch für die freundliche Beratung bei der statistischen Analyse meiner Daten.

An dieser Stelle möchte ich allen Mitarbeitern des Institutes für Immunologie danken, die mir bei allen praktischen und theoretischen Fragen immer hilfreich zur Seite standen.

Ein besonders herzlicher Dank geht an Frau Löbel für die unermüdliche Hilfsbereitschaft während der gesamten Zeit und bei allen Aufgaben.

Meinen Eltern und meinen Freunden Claudia, Slava, Holger, Heidi, Christine, Maria, Christoph, Anja F., Anja H. und Diana danke ich für ihre Liebe und Unterstützung.