

4. DISKUSSION

IL-12 favorisiert die Differenzierung naiver Th-Lymphozyten zu Th1-Zellen. Einige kürzlich publizierte Daten widersprechen jedoch der uneingeschränkten Notwendigkeit von IL-12 für die Induktion von Th1-Immunantworten (61). IL-12p40- oder IL-12R β 1-defiziente Patienten unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Suszeptibilität für Infektionen mit opportunistischen Pathogenen (64) von IL-12p40-defizienten Mäusen. Rhesusaffen sind genetisch und immunologisch eng mit dem Menschen verwandt, so dass Erkenntnisse aus diesem Modell eher auf die Situation im Menschen übertragen werden können. Um die Bedeutung von IL-12 für die Induktion T-zellvermittelter Immunantworten zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit IL-12-defiziente Rhesusaffen-DCs gewonnen und *in vitro* und *in vivo* hinsichtlich ihrer immunologischen Eigenschaften untersucht.

4.1. Gewinnung und In-Vitro-Untersuchungen IL-12-defizienter humaner und Rhesusaffen-DCs

Frühere Studien demonstrierten, dass die IL-12-Sekretion von DCs durch die Zugabe unterschiedlicher Stimuli, darunter Zytokine oder mikrobielle Produkte, differenziell beeinflusst werden kann (117, 131, 167, 168). In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein Stimulus identifiziert, der zur Gewinnung reifer IL-12-defizienter DCs führt. In initialen Experimenten wurde GA als ein geeigneter Kandidat für ein derartiges Agens betrachtet, da es selektiv die IL-12p70-Sekretion von DCs nach Stimulierung mit *E. coli*-LPS, einem Th1-fördernden TLR4-Liganden (167), inhibiert, ohne die immunostimulatorische Funktion der Zellen zu beeinflussen (125). GA führte jedoch nicht zur Aktivierung von Rhesusaffen-DCs. Ähnliche Resultate wurden bei GA stimulierten humanen DCs beobachtet (eigene Beobachtungen sowie (125)). Unreife DCs induzieren aber eher periphere Toleranz als Immunität *in vivo* (94, 169, 170), indem sie die Differenzierung antigenspezifischer IL-10-produzierender regulatorischer T-Zellen begünstigen (171). Aus diesem Grund war ein Stimulus notwendig, der zur DC-Aktivierung führte und gleichzeitig möglichst den bekannten IL-12-inhibierenden Effekt von

GA unterstützte. Basierend auf früheren In-Vitro-Studien mit humanen DCs, die zeigten, dass die Erhöhung der Konzentration des intrazellulären c-AMPs zur DC-Aktivierung bei gleichzeitiger Inhibierung der IL-12-Sekretion führt (131, 159), wurden humane DCs mit CT-, Forskolin- und d-cAMP stimuliert und im Hinblick auf die phänotypische Aktivierung analysiert. Dabei erwies sich d-cAMP als der effektivste Induktor phänotypischer Reifung. Vergleichbare Effekte hinsichtlich des Phänotyps wurden von Gagliardi et al. (51) bei humanen cAMP-Enhancer-stimulierten DCs beobachtet. Hierbei zeigten Forskolin-stimulierte DCs eine wenig ausgeprägte CD86- und CD83-Expression, während CT und d-cAMP zu einer deutlichen Erhöhung der Expression dieser DC-Aktivierungsmarker führten.

Die Stimulierung von unreifen Rhesusaffen-DCs mit der Kombination aus GA und d-cAMP führte zur effektiven Aktivierung der Zellen, was anhand der Morphologie, der Expression charakteristischer Oberflächenmarker wie CD80, CD86 oder CD83, sowie verminderter Antigenaufnahme dokumentiert wurde. GA/d-cAMP-aktivierte DCs unterschieden sich nicht von zytokinaktivierten DCs bezüglich dieser Parameter. Von Bedeutung im Hinblick auf die In-Vivo-Untersuchungen war die hohe CCR7-Expression GA/d-cAMP-aktivierter DCs, da eine vermehrte CCR7-Oberflächenexpression mit der Wanderungskapazität der DCs in die sekundären lymphatischen Organe assoziiert ist (172, 173).

GA/d-cAMP-aktivierte DCs zeigten im Vergleich zu zytokinaktivierten Zellen eine signifikante Reduktion der IL-12p40-Produktion. Hiermit korrelierte auch der Phosphorylierungsstatus der p38-MAP-Kinase, deren Aktivierung ein Schlüsselereignis im IL-12-Signaltransduktionsweg darstellt und die in GA/d-cAMP-stimulierten DCs nicht aktiviert wurde. So beeinflusst die GA/d-cAMP-Zugabe offenbar die Funktion von DCs durch Inhibierung der Sekretion sowohl von IL-12p40 als auch von IL-12p70, wie in den Experimenten von Vieira et al. gezeigt (125). Im Gegensatz dazu zeigten mit Zytokinen stimulierte DCs eine deutliche Phosphorylierung der p38-MAP-Kinase sowie ausgeprägte IL-12-Produktion. Hierbei handelte es sich höchstwahrscheinlich um IL-12p40 (bislang ist keine Methode verfügbar um Rhesusaffen-IL-12p70 selektiv nachzuweisen), da Zytokine

alleine keine IL-12p70-Sekretion induzieren können (55), sondern zwei synergistische Signale wie CD40L und TLR-Ligation (45, 174) oder IFN- γ (175) für eine effiziente IL-12p70-Sekretion durch DCs notwendig sind.

Dagegen zeigten GA/d-cAMP-aktivierte DCs eine vergleichbare CCL3-Produktion wie zytokinaktivierte DCs, und beide DC-Populationen sezernierten kein IL-10. Es ist aber nicht ausgeschlossen, dass GA/d-cAMP- und zytokinstimulierte DCs Unterschiede in der Sekretion anderer löslicher Immunmediatoren aufweisen, die hier nicht untersucht wurden. So zeigten Lebre et al. (176), dass IL-12p70-sezernierende, TNF- α /IL-1 β /LPS/IFN- γ -aktivierte DCs hauptsächlich inflammatorische Chemokine, darunter die CCR5-Liganden CCL4 und CCL5 sowie CXCL9 und CXCL10 produzieren, während CCL22 und CCL21 präferenziell von IL-12p70-defizienten TNF- α /IL-1 β /LPS/PGE₂-stimulierten DCs sezerniert wurden.

GA/d-cAMP-aktivierte Rhesusaffen-DCs stimulierten die Proliferation humaner T-Lymphozyten in einer xenogenen MLR effizienter als unreife DCs und verhielten sich in dieser Hinsicht wie zytokinaktivierte DCs. Vergleichbare Effekte wurden mit humanen CT und d-cAMP-aktivierten DCs als APCs und CD4⁺ T-Zellen beobachtet (159). Im Gegensatz dazu erwiesen sich DCs, deren IL-12-Produktion durch siRNA inhibiert wurde, als relativ schwache Stimulatoren allogener T-Lymphozyten (177). Allerdings sezernierten diese DCs vermehrt IL-10, welches unter Umständen die T-Zellproliferation inhibierte.

GA/d-cAMP-stimulierte DCs aktivierten mit vergleichbarer Effektivität wie zytokinaktivierte DCs antigenspezifische Th1-Gedächtniszellen. Diese Beobachtungen sind in Übereinstimmung mit kürzlich veröffentlichten Daten, die belegen, dass ATP/LPS-aktivierte IL-12p70-defiziente humane DCs in der Lage sind, Th1-Zellen in vitro zu aktivieren (55). Dies kann daran liegen, dass die Aktivierung von T-Lymphozyten, die sich im fortgeschrittenen Stadium der Differenzierung befinden, weniger abhängig von IL-12 ist, diese Zellen sensitiver auf geringe Konzentrationen von IL-12 reagieren, oder dass andere Th1-stimulierende Zytokine und Chemokine hierbei eine Rolle spielen. CCR5 ist ein charakteristischer Oberflächenmarker von Th1-Lymphozyten (178), so dass GA/d-

cAMP-aktivierte DCs unter Umständen über die Sekretion des CCR5-Liganden CCL3 präferenziell Th1-Lymphozyten rekrutieren und aktivieren könnten. So wurde im OVA-spezifischen TCR transgenen Mausmodell beobachtet, dass CCL3 über einen IL-12-unabhängigen Mechanismus IFN- γ -Sekretion von T-Zellen induzieren kann (179). In einem murinen Modell allergischer Lungenerkrankungen konnten IL-12-überexprimierende DCs die Entwicklung einer pathologischen Th2-Immunantwort verhindern, jedoch waren die Zellen nicht in der Lage eine präexistierende eosinophile Entzündung der Atemwege zu reduzieren, sondern verstärkten diese sogar (180). Zusammengefasst legen diese Daten nahe, dass IL-12-defiziente DCs sich wahrscheinlich nicht zur Hemmung bereits bestehender Th1-Immunantworten, z.B. zur Therapie von Autoimmunerkrankungen, eignen.

Die signifikanten Differenzen in der IL-12-Sekretion zwischen GA/d-cAMP- und zytokinaktivierten DCs spiegeln sich auch in der Kapazität der Zellen bezüglich der Polarisierung naiver CD4⁺ Lymphozyten wieder. So war der prozentuale Anteil IFN- γ -positiver aktivierter T-Lymphozyten geringer, wenn naive CD4⁺ T-Zellen durch GA/d-cAMP- verglichen mit zytokinaktivierten DCs stimuliert wurden. Demnach besitzen GA/d-cAMP-aktivierte, IL-12 defiziente DCs in vitro eine eingeschränkte Fähigkeit im Vergleich zu zytokinaktivierten DCs, naive T-Zellen zur IFN- γ -Produktion anzuregen. Vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der Th1-Polarisierung wurden in früheren In-Vitro-Studien mit humanen IL-12-defizienten DCs beobachtet. So zeigten Vieira et al. (125), dass GA/LPS-aktivierte DCs die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in IFN- γ produzierende Th-Zellen inhibieren. Auch Gagliardi et al. (131) dokumentierten eine reduzierte Th1-Polarisierung naiver CD4⁺ T-Zellen nach Stimulierung mit CT- verglichen mit LPS- oder CD40L-aktivierten DCs.

4.2. In-Vivo-Charakterisierung IL-12-defizienter DCs

4.2.1. Behandlung der Rhesusaffen mit rekombinanten humanen Zytokinen zwecks Steigerung der Monozytenzahlen

Ein kritischer Parameter für die Durchführung der In-Vivo-Untersuchungen bezüglich der immunologischen Eigenschaften GA/d-cAMP-aktivierter Rhesusaffen-DCs war die Gewinnung möglichst großer Zellzahlen monozytärer DC-Vorläuferzellen aus dem Blut. Obwohl die optimale Anzahl zu injizierender DCs für die Induktion effizienter Immunantworten gegen Proteinantigene in vivo unbekannt ist, wurde gezeigt, dass die Administration möglichst großer Zellzahlen und wiederholte Behandlungen zu effektiven, lang anhaltenden Immunantworten, speziell gegen wenig immunogene Antigene, führen kann (181). Da die gewonnenen DC-Zellzahlen trotz Entnahme maximaler Blutmengen oftmals niedrig waren, wurden die Spendertiere zur Steigerung der Monozytenzahl mit rekombinanten humanen Zytokinen wie GM-CSF oder G-CSF behandelt. Basierend auf Daten früherer Studien, die eine verzögerte Freisetzung von GM-CSF nach subkutaner Gabe dokumentierten (182) und höhere Steigerungsraten der Zellzahlen als nach intravenöser Infusion beschrieben (183), applizierten wir die Zytokine subkutan. Ferner ist diese Art der Behandlung schonender für die Tiere, da keine Narkose erforderlich ist. Die gewählte Dosis von 15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$ orientierte sich an den zuvor in Rhesusaffen verwendeten Mengen (5 - 25 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$). Die Behandlung der Rhesusaffen mit rhGM-CSF führte zu einer drastischen Zunahme der Anzahl CD11b⁺ DC-Vorläuferzellen im peripheren Blut. Nachteil war aber die Induktion neutralisierender anti-GM-CSF-Immunantworten, die bei Wiederbehandlung der Tiere zur vollständigen Inhibierung des GM-CSF-Effektes führten. Neutralisierende anti-GM-CSF-Antikörper werden auch bei einem beträchtlichen Anteil rhGM-CSF-behandelter Patienten induziert, wobei unterschiedliche Präparationen des Zytokins in ihrer Immunogenität stark variierten (184-188). Auch wenn in der vorliegenden Studie eine zuvor im Menschen als schwach immunogen befundene rhGM-CSF-Form appliziert wurde, sprechen diese Daten für die Verwendung speziesspezifischer GM-CSF-Präparationen in Primaten.

Im Gegensatz zu rhGM-CSF induzierte rhG-CSF in humanen Studien keine Antikörperbildung (184-188) und mobilisierte neben hämatopoietischen Stammzellen auch Blutmonozyten (189-191). Die subkutane rhG-CSF-Gabe führte bei Rhesusaffen zu einer 2-3-fachen Steigerung der peripheren Monozytenzahlen. Dieses war im Vergleich zu der ca. 30-fachen Erhöhung der Anzahl CD11b⁺ Zellen nach der rhGM-CSF-Behandlung deutlich geringer, allerdings waren mehrfache Behandlungen der Tiere möglich. Zwar wurde nach zweiter Behandlung bei einem von drei Tieren eine schwache anti-G-CSF-Antikörperbildung im Serum nachgewiesen, jedoch schienen diese Antikörper nicht neutralisierend zu sein, da die monozytenmobilisierende Wirkung des Zytokins nicht negativ beeinflusst wurde. Vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der Steigerung der Monozytenzahlen wurden nach subkutaner Applikation von rhG-CSF bei Patienten dokumentiert. So beobachteten Ueda et al. (192) nach Applikation des Zytokins einen 8-fachen Anstieg der Monozytenzahlen. Der Unterschied zu unseren Daten könnte in der Verwendung differenter rhG-CSF-Präparation begründet sein. Während wir Filgrastim, eine in *E. coli* hergestellte, nicht glykosylierte Form von G-CSF verwendeten, applizierten Ueda et al. (192) Lenograstim, eine in CHO-Zellen produzierte, glykosylierte G-CSF-Präparation. Die O-Glykosylierung stabilisiert die Konformation des Zytokins (193) und verleiht Resistenz gegen Serumproteasen (194). Eine weitere Erklärung könnte in der Kinetik der Monozytenmobilisierung liegen. So wurden die Monozytenzahlen bei Ueda et al. (192) am fünften Tag der rhG-CSF-Behandlung quantifiziert, während in der vorliegenden Arbeit, die Tiere neun Tage behandelt wurden.

Die Kultivierung G-CSF-mobilisierter Rhesusaffen-Monozyten mit GM-CSF und IL-4 führte zur Differenzierung der Zellen in intakte unreife DCs. Neben Rekonstitutionsstudien wurden auch bei Menschen DC-orientierte Untersuchungen nach G-CSF-Applikation durchgeführt. So differenzierten sich G-CSF-mobilisierte DC-Vorläuferzellen nach *in vitro* Kultivierung mit Zytokinen in DCs (195). Daneben wurde die Gewinnung funktional intakter DCs aus Leukophoreseprodukten G-CSF-behandelter Lymphom- oder Mammakarzinom-Patienten dokumentiert (196). Ueda et al. (192) zeigten, dass wenngleich G-CSF-

mobilisierte Monozyten nach LPS-Stimulierung weniger IL-12 und mehr IL-10 sezernieren, die Produktion proinflammatorischer Zytokine von aus diesen Monozyten differenzierten DCs nach LPS-Aktivierung nicht beeinträchtigt wurde. Zwar wurden in der vorliegenden Arbeit aus G-CSF-mobilisierten Monozyten differenzierte DCs nicht direkt mit DCs nicht behandelte Tiere verglichen, jedoch sezernierten die Zellen nach Aktivierung mit Zytokinen IL-12p40 und zeigten keine IL-10-Produktion.

4.2.2. In-Vivo-Migrationskapazität GA/d-cAMP-aktivierter DCs

Da die Lymphknoten der primäre Interaktionsort zwischen DCs und T-Lymphozyten sind, sollten funktional intakte DCs die Kapazität besitzen, von der Peripherie in die T-Zellzonen der sekundären Lymphknoten zu wandern. Um die Wanderung GA/d-cAMP-aktivierter Rhesusaffen-DCs nach Reinjektion in die Spendertiere nachverfolgen zu können, wurden die Zellen *in vitro* mit inerten lipophilen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die sich in die Zellmembran einlagern, ohne in der verwendeten Konzentration die Eigenschaften von Rhesusaffen-DCs zu beeinflussen (139). Der Zeitpunkt der Entnahme der drainierenden Lymphknoten (36 h nach DC-Injektion) lag in der vorliegenden Arbeit im Zeitfenster, welches für die Akkumulation subkutan oder intradermal injizierter DCs in den Lymphknoten in früheren DC-Migrationsstudien in Rhesusaffen beobachtet wurde (139, 164).

Nach subkutaner Injektion wurden keine DCs in den drainierenden Lymphknoten nachgewiesen. Dies war insofern überraschend, da in früheren Studien im Rhesusaffenmodell MCM (monozytenkonditioniertes Medium)-aktivierte DCs nach subkutaner Injektion in den T-Zellzonen der regionären Lymphknoten nachgewiesen werden konnten (139). Möglicherweise spielte der Reifungsstatus der applizierten Zellen hierbei eine Rolle, denn der Anteil CD83- oder CD86-exprimierender DCs war, unabhängig vom Aktivierungstimulus, relativ gering, so dass die Zellen verhältnismäßig unreif waren und womöglich deshalb ineffizient wanderten. Daten aus humanen DC-Migrationsstudien legen nahe, dass reife MCM/PGE₂/TNF- α -stimulierte DCs nach Reinjektion in die Haut deutlich effizienter in die parakortikale Zone der regionären Lymphknoten wanderten als

unreife DCs (102). Daneben zeigte diese Studie, dass reife DCs in mehreren Lymphknoten nachgewiesen werden konnten, während unreife DCs nie in mehr als einen Lymphknoten wanderten. Demnach könnte das Fehlen markierter DCs in den Lymphknotenpräparaten auch darin liegen, dass die Zellen zwar von der Peripherie über die afferenten Lymphgefäße wanderten, jedoch nur in einem einzigen Lymphknoten lokalisiert waren, wobei im vorliegenden Experiment nur ein Lymphknoten nach DC-Applikation entnommen und analysiert wurde. Daher ist es angezeigt bei Studien zur DC-Wanderung alle drainierenden Lymphknoten in der Nähe der Injektionsstelle zu entnehmen und zu analysieren.

Da Studien mit CD40L-aktivierten Rhesusaffen-DCs dokumentierten, dass eine intradermale Injektion ebenfalls zur Wanderung der DCs in die Lymphknoten führt (164), und eine komparative Analyse der Wanderungskapazität zytokinaktivierter humaner DCs die Überlegenheit der intradermalen im Vergleich mit subkutaner Applikationsroute darlegte (165), wurde daraufhin entschieden, die Zellen intradermal zu applizieren. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der drainierenden Lymphknoten nach intradermaler Injektion erlaubte den Nachweis GA/d-cAMP- und zytokinaktivierter DCs. Vereinzelt wurden grüne und orange Profile detektiert, und eine komparative quantitative Analyse der Migration GA/d-cAMP- und zytokinaktivierter DCs war somit nicht sinnvoll. Auch Barratt-Boyes et al. (164) berichteten von einer relativ ineffizienten DC-Migration in die drainierenden Lymphknoten nach intradermaler Injektion CD40L-aktivierter Rhesusaffen-DCs. Hierbei lag der Anteil eingewanderter DCs in Zellsuspensionen von Lymphknotenbiopaten, die 36 h nach DC-Injektion entnommen wurden, im Vergleich zu der Anzahl injizierter DCs bei 0,11 %. Vergleichbar niedrige DC-Wanderungsraten wurden auch im Menschen festgestellt. So erreichten nach intradermaler Administration weniger als 5% MCM-aktivierter DCs die Lymphknoten (197). Quillien et al. (198) berichteten, dass dieser Anteil bei Ribomunyl/IFN- γ -aktivierten DCs sogar nur 1-2 % beträgt.

Um die genaue Lokalisation der GA/d-cAMP-aktivierten DCs im Lymphknoten zu bestimmen, wurde daraufhin auf den Vergleich mit zytokinaktivierten DCs verzichtet, was die Injektion einer höheren DC-Anzahl erlaubte. Die

Lymphknotenpräparate wurden immunhistochemisch mit einem anti-Fluoreszein mAb gefärbt und damit die eingewanderten fluorochrommarkierten DCs innerhalb der Lymphknoten visualisiert. Die applizierten GA/d-cAMP-stimulierten DCs waren vereinzelt im Marginalsinus nachzuweisen, der überwiegende Anteil der DCs war in den parakortikalen T-Zellzonen lokalisiert, während die B-Zellfollikel frei von Fluoreszein-positiven DCs waren. Eine ähnliche Verteilung eingewanderter DCs im Lymphknoten wurde in einer früheren Studie nach subkutaner Injektion MCM-aktivierter Rhesusaffen-DCs beobachtet (139). Die Fluoreszein-positiven DCs zeigten eine Doppelfärbung mit CD83, also handelte es sich um phänotypisch reife Zellen. Eine Doppelfärbung mit CD1a war nicht nachzuweisen. Die Lokalisation Fluoreszein/CD83-doppeltpositiver DCs innerhalb der Lymphknotenstruktur war vergleichbar mit derjenigen CD83-positiver residenter DCs. Die Wanderung von DCs wird chemotaktisch reguliert. Eine besondere Rolle spielt hierbei PGE₂, das essentiell für die Migration monozytenabstammender DCs zu sein scheint (173, 199, 200). Daher erschien die Migration GA/d-cAMP-stimulierter DCs auf den ersten Blick überraschend, da nur zytokinaktivierte DCs eine PGE₂-Exposition erfahren haben. Die Wanderungskapazität GA/d-cAMP-aktivierter DCs ist jedoch wahrscheinlich die Folge einer d-cAMP induzierten autokrinen PGE₂-Sekretion (201). PGE₂ kann die Expression des CCR7 heraufregulieren (173, 199), der die Wanderung myeloider DCs in die afferenten Lymphgefäße und die Lokalisierung der DCs innerhalb der Lymphknoten kontrolliert (202-205). Tatsächlich wiesen GA/d-cAMP-stimulierte DCs eine hohe CCR7-Oberflächenexpression auf, die die Migration dieser DCs in die regionären Lymphknoten erlaubt.

4.2.3. Immunologische Eigenschaften GA/d-cAMP-aktivierter DCs in vivo

Die Notwendigkeit der Applikation möglichst hoher DC-Zellzahlen ergibt sich aus der Beobachtung, dass nur eine limitierte Anzahl der DCs funktional aktiv ist und die regionären Lymphknoten erreicht (eigene Beobachtungen sowie (164)). Ferner gibt es Hinweise aus humanen Tumorstudien, dass die Verwendung höherer DC-Zellzahlen bessere immunologische Effekte zur Folge hat, ohne eine

dosislimitierende Toxizität aufzuweisen (206). Die hohen DC-Zellzahlen, die bei humanen Tumorstudien verabreicht wurden (4×10^6 DCs/Injektion, (121) sind bei Rhesusaffen sogar nach rhG-CSF-Monozytenmobilisierung nicht realisierbar, so dass die minimal zu applizierende DC-Zellzahl pro Injektion auf 5×10^5 festgelegt wurde. Die Verabreichung vergleichbar hoher Zellzahlen antigenbeladener DCs führte in früheren Rhesusaffenstudien zur Induktion antigenspezifischer $CD4^+$ -T-Zellimmunantworten (139). Das Modellantigen KLH wurde zuvor in zahlreichen humanen und Rhesusaffenstudien (121, 139, 146) zur Evaluierung der In-Vivo-Effizienz applizierter DCs hinsichtlich der Induktion proteinantigenspezifischer T-zellvermittelter Immunantworten verwendet. Basierend auf der eingangs nach intradermaler, jedoch nicht nach subkutaner Injektion beobachteten Wanderung GA/d-cAMP-aktivierter DCs, wurde die intradermale Applikationsroute gewählt, wobei die DC-Injektionen bis zu dreimal wiederholt wurden.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der komparativen Reinjektionsstudie mit KLH-beladenen GA/d-cAMP- und zytokinaktivierten Rhesusaffen-DCs ließen sich keine Unterschiede zwischen den beiden DC-Populationen im Hinblick auf die untersuchten immunologischen Parameter (Expansion regulatorischer T-Zellen, antigenspezifische T-Zellproliferation und Zytokinproduktion) feststellen. Sowohl die Applikation GA/d-cAMP- als auch zytokinaktivierter DCs führte zu einer transienten Expansion peripherer $CD4^+Foxp3^+$ Tregs. Diese Daten korrelieren mit den Ergebnissen einer kürzlich publizierten Studie mit reifen humanen DCs. Dabei führten zytokinaktivierte DCs nach Reinjektion in Myelompatienten zu einem 2-3-fachen Anstieg der Anzahl funktional aktiver $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs (207). In der vorliegenden Arbeit schien der mittlere Anstieg der $CD4^+Foxp3^+$ Tregs bei den Empfängertieren GA/d-cAMP-aktivierter DCs (5,2-fach) ein wenig höher zu sein als bei den Empfängertieren zytokinaktivierter DCs (3,4-fach), jedoch lassen sich aufgrund der geringen Tierzahl pro Gruppe keine statistischen Unterschiede angeben. Inwieweit die $CD4^+Foxp3^+$ T-Zellpopulation einen Einfluss auf die Anzahl und Funktion simultan induzierter KLH-spezifischer T-Effektorzellen besaß, bedarf weitergehender Untersuchungen. IL-10-Sekretion, die mit der

Induktion antigenabhängiger regulatorischer Tr1-Lymphozyten assoziiert ist (158, 171, 208) wurde in den Zellkulturüberständen KLH-stimulierter PBMCs der injizierten Tiere nicht nachgewiesen.

Nach den Injektionen KLH-beladener GA/d-cAMP- und zytokinaktivierter DCs wurden, im Gegensatz zu früheren Untersuchungen KLH-beladener, zytokinaktivierter DCs im Rhesusaffen (139) und zu Studien mit humanen KLH-beladenen DCs (121, 123, 146), vergleichsweise schwache antigenspezifische T-Zellimmunantworten beobachtet. Der Hauptunterschied zwischen den erwähnten Studien und den hier durchgeführten Experimenten bestand darin, dass die DCs in dieser Arbeit ausschließlich mit KLH beladen wurden. In Gegensatz dazu wurden DCs, die zur Induktion starker KLH-spezifischer Immunantworten im Rhesusaffen geführt haben, zusätzlich mit Vogelpockenviren infiziert und mit Tetanustoxoid beladen (139, 147). Auch in Studien mit humanen DCs wurden die Zellen neben KLH mit weiteren Antigenen wie tumorspezifischen Peptiden (102, 121, 146) oder Influenza-Matrixpeptid beladen (155), für die präexistierende Immunantworten nicht ausgeschlossen werden können oder bei einigen Studienteilnehmern sogar demonstriert wurden. Folglich könnten in diesen Studien KLH-unspezifische, voraktivierte T-Lymphozyten zusätzliche Signale, z.B. über die CD40-Ligation oder IFN- γ -Sekretion, geliefert haben, die zur Induktion stärkerer KLH-spezifischer Immunantworten beigetragen haben.

Auffallend in der vorliegenden Arbeit war, dass die Tiere nach Injektion GA/d-cAMP- und zytokinaktivierter DCs mit einem vergleichbaren antigenspezifischen Zytokinsekretionsmuster reagierten. Alle Tiere zeigten KLH-spezifische IL-2-Sekretion. IFN- γ -Produktion wurde bei jeweils einem Empfängertier von GA/d-cAMP- und- zytokinaktivierten DCs in den Zellkulturüberständen KLH-stimulierter PBMCs gemessen. Überdies wurde zu keinem Zeitpunkt IL-4 oder IL-10 in den Zellkulturüberständen nachgewiesen. Diese Daten werden durch die Resultate der Analyse der Zytokinproduktion in vitro generierter KLH-spezifischer CD4⁺-T-Zelllinien gestützt. Hierbei produzierte der Großteil der CD4⁺-T-Lymphozyten bei sämtlichen Tieren IFN- γ und TNF- α , während die Anzahl IL-4- oder IL-10-produzierender CD4⁺-T-Lymphozyten deutlich geringer war. Die ausgeprägte

Produktion von IFN- γ deutet auf die Induktion von Th1-Lymphozyten hin. Es gibt Hinweise, dass IL-12 für die Induktion von Th1-Immunantworten bei Primaten weniger essentiell ist als bei Nagetieren. Während IL-12p40-defiziente Mäuse eine breite Suszeptibilität gegen eine Vielzahl intrazellulärer Erreger zeigen, sind IL-12p40-defiziente Patienten, abgesehen von einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber schwach virulenten Mykobakterienstämmen oder Salmonellen (63, 209), resistent gegen viele intrazelluläre Mikroorganismen. So scheint IL-12 beim Menschen eine redundante Rolle im Hinblick auf die Induktion protektiver Immunität gegen zahlreiche Infektionserreger zu spielen (64). Möglicherweise haben somit andere Zytokine oder Chemokine, wie CCL3, welches von GA/d-cAMP-aktivierten DCs sezerniert wurde, zu der Induktion von Th1-Lymphozyten *in vivo* beigetragen.

Daneben wurde IL-17 in den Zellkulturüberständen KLH-spezifischer T-Zelllinien bei sämtlichen Tieren, unabhängig vom Stimulus der ursprünglich zur Aktivierung der injizierten DCs führte, nachgewiesen. Diverse kürzlich publizierte Studien, zeigen, dass IL-23 zur Differenzierung von Th17-Lymphozyten beiträgt (166). Bei In-Vitro-Untersuchungen mit humanen Zellen stieg die Frequenz IL-17-produzierender CD4⁺T-Lymphozyten in Gegenwart von IL-23, während IL-12p70 die Differenzierung dieser Zellen inhibierte (210). Da GA/d-cAMP- und zytokinstimulierte DCs auch nach Restimulierung mit CD40L kein IL-12p70 sezernierten, könnte das Fehlen dieses IL-17-Antagonisten und die Sekretion von IL-23 dazu beitragen, dass neben IFN- γ -sezernierenden CD4⁺-T-Lymphozyten, auch IL-17-Produktion beobachtet wurde. Eine kürzlich publizierte Studie, zeigte dass der nukläere Rezeptor ROR γ t für die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Lymphozyten in Th17-Effektorzellen essentiell zu sein scheint (211). Interessanterweise exprimierte eine Fraktion der ROR γ t-positiven Zellen sowohl IFN- γ als auch IL-17. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die gleichzeitige Präsenz von IFN- γ und IL-17 in KLH-spezifischen T-Zelllinien nachgewiesen, jedoch wurde nicht auf Einzelzellebene untersucht, ob beide Zytokine von ein und derselben CD4⁺ T-Zellpopulation sezerniert werden.

Wie lassen sich die qualitativ ähnlichen In-Vivo-Immunantworten erklären, obwohl die applizierten DCs *in vitro* different aktiviert wurden und sich signifikant in der

IL-12-Sekretion unterschieden? Nach Reinjektion könnte während der Migration von der Dermis in die regionären Lymphknoten eine Vielzahl von Faktoren die Eigenschaften der DCs beeinflusst haben. So zeigten GA/d-cAMP-aktivierte DCs eine hohe Oberflächenexpression von CD40, dessen Ligation an CD40L-exprimierende Zellen zur IL-12-Sekretion durch die DCs führen könnte. In der Tat produzierten GA/d-cAMP-aktivierte DCs nach Restimulierung mit rekombinantem Rhesusaffen-CD40L-Multimeren IL-12p40 in vergleichbaren Konzentrationen wie CD40L-restimulierte, zytokinaktivierte DCs. Da die p40-Untereinheit sowohl Bestandteil von IL-12 als auch IL-23 sein kann, wurde nun genauer mit IL-12p70 und IL-23 -spezifischen ELISAs untersucht um welches Zytokin es sich handelt. Weil kein kommerziell erhältlicher ELISA-Antikörper verfügbar ist, der spezifisch Rhesusaffen-IL-12p70 erkennt, wurde dieses Zytokin in identisch stimulierten humanen DCs quantifiziert und sowohl GA/d-cAMP- als auch zytokinaktivierte humane DCs sezernierten kein IL-12p70. Ähnliche Resultate wurden von Vieira et al. (125) mit humanen GA/LPS-aktivierten DCs, die mit einer CD40L-transfizierten Zelllinie restimuliert wurden gezeigt. Die Resultate früherer Studien, die die Induktion der IL-12p70-Sekretion durch CD40-Signaling allein zeigten (212, 213), sind wahrscheinlich auf Kontamination der CD40-Agonisten durch TLR-Liganden (Endotoxine) oder proinflammatorische Zytokine zurückzuführen (214).

Nach CD40L-Restimulierung sezernierten sowohl GA/d-cAMP- als auch zytokinaktivierte DCs IL-23. In Übereinstimmung mit den hier präsentierten Daten, führte die CD40-vermittelte Stimulierung muriner DCs ebenfalls zur IL-23-Produktion in vitro (59). Daneben wurde IL-23-Sekretion in vivo nach Injektion eines agonistischen anti-CD40 mAbs in T- und B-Zell-defizienten Mäusen induziert (215). Während naive murine T-Zellen durch IL-23 nicht aktiviert werden können, induziert das Zytokin bei humanen CD45RA⁺-T-Lymphozyten Zellproliferation und IFN- γ -Produktion in vitro (30). Kürzlich publizierte murine Studien demonstrierten die In-Vivo-Induktion von Th1-Immunantworten durch IL-23. So zeigte die Untersuchung einer *M. tuberculosis*-DNA-Vakzine in Verbindung mit einem IL-23-exprimierenden Plasmid in IL-12p40-defizienten Mäusen, dass IL-23 in Abwesenheit von IL-12 zur Induktion starker Th1-Immunantworten führen kann,

die durch antigenspezifische Zellproliferation und IFN- γ -Sekretion gekennzeichnet sind und partielle Protektion gegen Aerosolinfektion mit *M. tuberculosis* verleihen (216). Khader et al. (217) beobachteten in IL-12p35-defizienten Mäusen, dass IL-23 in Abwesenheit von IL-12p70 IFN- γ -sezernierende CD4⁺ T-Zellen aktiviert und eine moderate Protektion gegen *M. tuberculosis*-Infektion verleihen kann. Daneben zeigt eine Studie mit humanen DCs, dass die Infektion der Zellen mit *Bordetella pertussis* zu einer cAMP-vermittelten Inhibierung der IL-12p35-Expression führt, und solche DCs IL-23 jedoch nicht IL-12p70 sezernieren sowie Th1-Immunantworten in vitro induzieren (57, 218). Insofern ist es denkbar, dass GA/d-cAMP-aktivierte DCs nach Interaktion mit CD40L-exprimierenden T-Zellen in vivo IL-23 sezernieren und dieses Zytokin, unter Umständen im Kontext mit anderen stimulatorischen Molekülen wie z.B. CCL3 oder bislang unbekanntem Zytokinen und Chemokinen die Qualität von Th-Immunantworten beeinflussen kann. Daneben spielt IL-23 eine wichtige Rolle für die Differenzierung IL-17-sezernierender Th-Zellen (67) und IL-17-Sekretion wurde auch bei den KLH-spezifischen T-Zelllinien der injizierten Tiere beobachtet. Eine kürzlich publizierte Studie im murinen Modell zeigt nach Vakzinierung mit einem *M. tuberculosis*-spezifischen Peptid die Induktion einer Population IL-23-abhängiger, IL-17-produzierender, antigenspezifischer T-Zellen in der Lunge (219). Die Recall-Immunantwort dieser T-Zellpopulation ging einher mit der Sekretion von CXCR3-Liganden, die IFN- γ -sezernierende CD4⁺ T-Zellen in die Lunge rekrutierten. Sowohl Th1 als auch Th17-Zellen können TNF- α sezernieren, welches in der vorliegenden Arbeit ebenfalls auf Einzelzellebene in den KLH-spezifischen CD4⁺-T-Zelllinien nachgewiesen wurde. Dies legt nahe, dass in vivo, unabhängig von dem Stimulus der zur Aktivierung der DCs in vitro verwendet wurde, gemischte Th1/Th17-Immunantworten induziert wurden. Die simultane Expression von IFN- γ und IL-17 wie in der vorliegenden Studie, wurde auch bei EAE in vivo festgestellt (220).

Die hier beschriebenen Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass die Induktion zellulärer Immunantworten im Primaten ein hoch komplexer Prozess zu sein scheint, bei dem eine Vielzahl löslicher und zellgebundener Mediatoren

involviert ist. Die Induktion ähnlicher Th-Immunantworten durch IL-12-defiziente und IL-12-produzierende DCs *in vivo*, suggeriert, dass die bloße Präsenz oder Abwesenheit eines einzigen Moleküls höchstwahrscheinlich für die Art der induzierten Immunantwort nicht maßgebend ist.