

**Medizinische Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin**

Campus Benjamin Franklin

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Eckhard Thiel

**Charakterisierung von dendritischen Zellen nach *in vitro*  
Generierung aus konditionierten Medien mithilfe von CpG-  
Oligonukleotiden oder bakteriellen Extrakten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der  
medizinischen Doktorwürde

Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von Mareen Reichert aus Lutherstadt Wittenberg

Referent: Prof. Dr. med. Carmen Scheibenbogen

Koreferent: Prof. rer. nat. Andreas Ziegler

Datum der Promotion: 03. September 2010

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

## Inhaltsverzeichnis

<b>0.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>4</b>
<hr/>		
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
<hr/>		
1.1.	Einführung in das Thema	6
1.2.	Morphologie und Oberflächenmarker-Profil dendritischer Zellen	7
1.3.	Differenzierungsweg	8
1.4.	Physiologie dendritischer Zellen	9
1.5.	Bakterielle Extrakte und CpG-Oligonukleotide als Aktivatoren von Immunzellen	10
1.6.	Zusammenspiel verschiedener Zytokine	12
1.7.	Zielsetzung und Herangehensweise der vorliegenden Arbeit	13
<b>2.</b>	<b>Material</b>	<b>14</b>
<hr/>		
2.1.	Labormaterialien	14
2.2.	Reagenzien	14
2.2.1.	Grundsubstanzen und Lösungen	14
2.2.2.	Zytokine und Chemokine	15
2.2.3.	Peptide	15
2.2.4.	Puffer	15
2.2.5.	Zellkulturmedien	15
2.2.6.	CpG-Oligonukleotide	16
2.2.7.	Bakterielle Extrakte	16
2.2.8.	Antikörper und Reagenzien für die Durchflusszytometrie	16
2.2.9.	Andere FACS-Reagenzien	17
2.3.	Kits und Arrays	17
2.4.	Geräte	18

### **3. Methoden** **19**

---

3.1.	Isolierung von PBMCs aus peripherem Blut und Buffy Coats	19
3.2.	Zellzählung, Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	19
3.3.	Herstellung von konditionierten Medien	20
3.4.	Adhärenztrennung und Kultur von DCs	20
3.5.	Durchflusszytometrische Phänotypisierung	21
3.5.1.	Extrazelluläre FACS-Färbung mit Oberflächenantikörpern	21
3.5.2.	Durchflusszytometrische Messungen	22
3.5.3.	Bestimmung HLA-A2 positiver Blutspender	23
3.6.	CFSE-Proliferationsassays	23
3.6.1.	Isolation von Pan-T-Zellen aus PBMCs	23
3.6.2.	Proliferation von allogenen T-Zellen in der gemischten Lymphozytenkultur	24
3.7.	Spezifische Kokultur von NACs mit Antigen beladenen DCs	25
3.7.1.	Expansion von spezifischen CD8 <sup>+</sup> -Lymphozyten	25
3.7.2.	Intrazelluläre FACS-Färbung	26
3.7.3.	Durchflusszytometrische Messung der spezifischen Peptid-Kultur	26
3.8.	Zytokinanalysen	27
3.9.	Endozytoseassays (Dextran-FITC-uptake durch DCs)	29

### **4. Ergebnisse** **30**

---

4.1.	Isolierung von PBMCs aus peripherem Blut und Buffy Coats	30
4.2.	Zellzahlentwicklung und Zellmorphologie	30
4.3.	Herstellung von konditionierten Medien	31
4.4.	Kultur von mMoDCs	31
4.5.	Phänotypisierung	32
4.5.1.	Identifizierung von HLA-A2 positiven Spendern	32
4.5.2.	Durchflusszytometrische Phänotypisierung von DCs	32
4.6.	CFSE-Proliferationsassays	39
4.7.	Spezifische Kokultur von NACs mit Antigen beladenen DCs	40
4.8.	Zytokinprofile	42
4.8.1.	Zytokinanalysen in den konditionierten Medien	42
4.8.2.	Zytokinanalysen in den Kulturüberständen der mMoDCs	46
4.9.	Endozytoseassays (Dextran-FITC-uptake durch DCs)	48

<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>50</b>
5.1.	Konditionierte Medien als Alternative zur DC-Aktivierung?	50
5.2.	Generierung und phänotypische Eigenschaften von DCs	51
5.3.	Funktionelle Beurteilung der DCs	52
5.4.	Zytokinprofile der konditionierten Medien und der DC-Kulturen	53
5.5.	Klinischer Ausblick: CpG-Oligonukleotide in der Therapie von Tumoren und Infektionskrankheiten	55
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>56</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>58</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>63</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>64</b>

## 0. Abkürzungsverzeichnis

---

12V	K-ras-12V-Peptid
μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
AA	Aminosäure
Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
BCG	Bacillus-Calmette-Guerin
BeCM	Konditioniertes Medium aus der Begrivac <sup>®</sup> -Kurzkultur
Be+S	Kombination aus bakteriellen Extrakten (Begrivac <sup>®</sup> + Symbioflor <sup>®</sup> )
BFA	Brefeldin A
BSA	Bovines Serumalbumin
CC	Zytokin-Cocktail (bestehend aus TNF-α, IL-1β, PG-E <sub>2</sub> , IL-6)
CD	Cluster of differentiation
CFA	Freund's complete adjuvant
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester
CM	Konditioniertes Medium (Überstand aus Kurzkulturen)
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CpG	Immunstimulatorische unmethylierte Nukleotidsequenz (Deoxycytidylat-Phosphat-Deoxyguanylat)
CpG-A-CM	Konditioniertes Medium aus der CpG-A-Kurzkultur
CpG-B-CM	Konditioniertes Medium aus der CpG-B-Kurzkultur
CpG-C-CM	Konditioniertes Medium aus der CpG-C-Kurzkultur
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DC	Dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluorescence-activated-cell-sorter, Durchflusszytometer
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FLU	Influenza-Peptid
FSC	Vorwärtsstreulicht (Forward scatter)
g	Zentripetalbeschleunigung der Erde
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
Gy	Gray
HIV	HIV (human immunodeficiency virus) -Peptid

HRP	Horse radish Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
imMoDC	Aus Monozyten generierte unreife dendritische Zelle
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
min	Minute
mMoDC	Aus Monozyten generierte reife dendritische Zelle (mature monocyte derived dendritic cell)
MoDC	Aus Monozyten generierte dendritische Zelle (monocyte derived dendritic cell)
NAC	Nicht adhärente Zelle (non adherent cell)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
ODN	Oligodesoxyribonukleotid
PBMC	Mononukleäre Zelle aus dem peripheren Blut
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PE	R-Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll-Protein
PG-E <sub>2</sub>	Prostaglandin-E <sub>2</sub>
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
SSC	Seitwärtsstreulicht (Side scatter)
SyCM	Konditioniertes Medium aus der Symbioflor <sup>®</sup> -Kurzkultur
Th	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
TLR	Toll-Like-Rezeptor
U	Einheit
UM	Unstimuliertes Medium

## 1. Einleitung

---

### 1.1. Einführung in das Thema

Mit der Erkenntnis, dass dendritische Zellen (dendritic cells, DCs) eine zentrale Rolle bei der Abwehr von Infektionskrankheiten spielen, wuchs das Interesse, DCs für die Modulation der zellulären Immunantwort beim Menschen einzusetzen. Lange wurden die Identität und die Rolle der DCs in Abgrenzung von anderen potenziell Antigen präsentierenden Zellen (z.B. Makrophagen, B-Zellen) kontrovers diskutiert. Heute wird weitgehend akzeptiert, dass DCs eine Schlüsselrolle für die Induktion von T-Zell-Antworten *in vivo* einnehmen. Sie sind die einzigen Zellen, die in Abwesenheit von aktivierten T-Zellen professionell Antigene präsentieren und gleichzeitig kostimulieren können (Janeway 2001). Als hocheffiziente Antigen präsentierende Zellen sind DCs in der Lage, protektive und therapeutische Antitumor-Immunitäten im Tiermodell zu erzeugen (Mayordomo et al. 1995, Zitvogel et al. 1996). Auch im menschlichen Organismus konnten Immunantworten gegen Tumorantigene in Studien hervorgerufen werden. Dabei wurden DCs aus dem peripheren Blut der Patienten isoliert, *in vitro* mit Tumorantigenen beladen und den Patienten injiziert. In einigen Fällen mit fortgeschrittenen Tumorstadien zeigten sich Hinweise auf einen klinischen Effekt (z.B. Timmerman et al. 2002, Fong et al. 2001, Kugler et al. 2000).

In den letzten Jahren wurde festgestellt, dass auch bestimmte DNA-Sequenzen (immunstimulatorische, unmethylierte Nukleotidsequenzen, sogenannte CpG-Motive) eine funktionelle Bedeutung für die Aktivierung von DCs haben können. CpG-Motive sind nichtmethylierte Cytidin-Guanosin-Dinukleotide mit bestimmten flankierenden Basensequenzen in der bakteriellen oder viralen DNA, die so nicht in der Wirbeltier-DNA vorkommen. Man nimmt an, dass diese CpG-Motive vom menschlichen Organismus als „fremde“ DNA erkannt werden, so dass dadurch eine Immunreaktion gegen Mikroorganismen hervorgerufen wird. Synthetische Oligonukleotide mit solchen CpG-Motiven können hergestellt und für die Induktion einer spezifischen Immunreaktion genutzt werden. DCs, die mit CpG-Oligonukleotiden aktiviert wurden, zeigten eine höhere Expression von Reifemarkern und stimulierten alloreaktive T-Zellen stärker als die mit Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) aktivierten DCs (Brunner et al. 2000). CpG aktivierte DCs sind in der Lage, Antigen spezifische T-Zell Immunantworten gegen bakterielle und virale Erreger zu induzieren. CpG-Oligonukleotide können durch hohe Interferon (IFN)-Produktion in PBMCs (mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut) T-Zell- und Natürliche Killer-(NK)-Zell-Antworten auslösen (Rothenfusser et al. 2001).



## 1.2. Morphologie und Oberflächenmarker-Profil dendritischer Zellen

Im Jahr 1868 beschrieb der junge Student Langerhans in Berlin erstmals morphologisch dendritische interdigitierende Zellen in der Haut. Über ihre Biologie und Funktion jedoch konnten lange Zeit nur Vermutungen angestellt werden. 1973 entdeckten Steinman und Cohn in der Mäusemilz eine adhärente Zellpopulation mit sternförmigen Zytoplasma-Ausläufern und definierten sie aufgrund ihrer verzweigten bäumchenartigen Morphologie als DCs. Ab 1974 wurden solche DCs auch beim Menschen in peripheren lymphatischen Organen sowie in nicht lymphatischen Geweben nachgewiesen (Steinman et al. 1974). Die gemeinsame Eigenschaft aller DCs aus verschiedenen Organen der Säugetiere wurde als Fähigkeit zur Induktion von Antigen spezifischen Immunantworten charakterisiert (Steinman et al. 1978). Diese Annahme wurde in den folgenden Jahren durch den Nachweis einer Mitbeteiligung von DCs an zellulären Abstoßungsreaktionen bei Herz- und Nierentransplantationen unterstützt (Hart et al. 1983, McKenzie et al. 1984).

In den 90er Jahren wurde es methodisch möglich, DCs auch in größeren Zellzahlen aus Mäusen (Inaba et al. 1992) und Menschen (Romani et al. 1994, 1996) zu isolieren, wodurch die *in vitro* Kultivierung, Charakterisierung und Erforschung dieser Zellen beschleunigt bzw. erst ermöglicht wurde. Heute weiß man, dass es sich bei den DCs um eine spezielle Leukozytenpopulation handelt, die mit Effektorzellen sowohl des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems interagiert.

Es wird geschätzt, dass im menschlichen Körper nur rund 2 % aller Leukozyten DCs sind. Sie finden sich in fast allen Organsystemen, insbesondere im oberen Respirationstrakt, in der Haut und im Gastrointestinaltrakt, wo sie als wichtige Zellen für eine Immunabwehr fungieren.

Studien zur Charakterisierung und Phänotypisierung von DCs haben ergeben, dass DCs eine sehr heterogene Zellpopulation darstellen, die in verschiedenen Stadien der Zellreifung vorliegen und unterschiedliche phänotypische und funktionelle Eigenschaften aufweisen. DCs können von anderen Leukozyten durch ihre Zellmorphologie und ihren unterschiedlichen Oberflächenmarker-Profilen unterschieden werden. Es fehlen Marker wie CD3 (T-Lymphozyten), CD14 (Makrophagen, Monozyten) und CD19 (B-Lymphozyten). Charakteristische Oberflächenmarker von DCs sind Antigen präsentierende Moleküle (z.B. den Haupthistokompatibilitätskomplexen MHC I+II, CD1), Adhäsionsmoleküle (CD54, CD58) und kostimulatorische Moleküle (CD40, CD80, CD86). Auf unreifen DCs sind überwiegend Rezeptoren für die Antigenaufnahme mittels Phagozytose (CD16, CD32, CD64) nachweisbar. Nach Aktivierung unreifer DCs werden diese Phagozytose-Rezeptoren weniger exprimiert, die reifen DCs dagegen exprimieren verstärkt den „Reifemarker“ CD83 (De Saint-Vis et al. 1998, Zhou et al. 1995). Es kommt zu einer erhöhten Dichte von Antigen präsentierenden und kostimulierenden Molekülen auf der Zelloberfläche, wie z.B. den MHCs, den

Oberflächenmarkern CD80, CD86 und CD40. CD14 als Monozyten-spezifischer Marker wird weniger exprimiert (Gursel et al. 2002). Die Tabelle 1 zeigt eine Übersicht von dendritischen Oberflächenmarkern.

**Tabelle 1:** Ausgesuchte Oberflächenmarker von dendritischen Zellen (modifiziert nach Janeway/Travers: Immunologie, 1995)

CD14	Auf myelomonozytischen Zellen; Rezeptor für den Komplex aus Lipopolysaccharid (LPS) und LPS bindendem Protein
CD16	Auf neutrophilen Zellen, NK-Zellen, Makrophagen; vermittelt die Phagozytose und die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
CD40	Auf B-Zellen, Monozyten, DCs; Rezeptor für kostimulierende Moleküle, für B-Zellen, bindet den CD40 Liganden
CD64	Auf Monozyten und Makrophagen, hochaffiner Rezeptor für IgG-Antigen-Komplexe, Endozytose, Antigenaufnahme zur T-Zell-Präsentation
CD80	Auf Untergruppen von B-Zellen und auf DCs; Kostimulator zur T-Zell-Aktivierung zusammen mit CD86
CD83	Auf aktivierten B-Zellen, aktivierten T-Zellen, zirkulierenden DCs, Funktion unbekannt, Reifemarker auf DCs
CD86	Auf Monozyten, aktivierten B-Zellen, DCs, Kostimulator zur T-Zell-Aktivierung zusammen mit CD80
CD123	Auf Knochenmarksstammzellen, Granulozyten, Monozyten, Megakaryozyten, DCs, Untereinheit des IL-3 Rezeptors
CD206	Reguliert die Endozytose von Glycokonjugaten mit endständiger Mannose, Fucose, N-Acetylglucosamine oder Glucose-Resten
CD209	Auf DCs, die aus Monozyten generiert wurden (MoDCs), wirkt an der Interaktion zwischen MoDCs und naiven T-Lymphozyten, reguliert die T-Zell-Proliferation
HLA-DR	Expression auf Antigen präsentierenden Zellen, B-Zellen, aktivierten T-Zellen: Teil des MHC II

### 1.3. Differenzierungsweg

Die Entwicklung von DCs *in vivo* beginnt mit den pluripotenten Stammzellen im Knochenmark. Dabei werden lymphoide und myeloide Vorläuferzellen unterschieden. Aus lymphoiden Zellen entwickeln sich einerseits thymusständige Zellen mit der Aufgabe, autoreaktive T-Zellen zu eliminieren, um somit Autoimmunreaktionen gegen eigenes gesundes Gewebe zu verhindern (Ardavin 1997). Auf der anderen Seite differenzieren sich aus lymphoiden Zellen plasmazytoide DCs, die mit ihrer Ausschüttung hoher Mengen an IFN- $\alpha$  vorwiegend an viralen Abwehrreaktionen beteiligt sind (Siegal et al. 1999, Cella et al. 1999).

Myeloide DCs spielen dagegen eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung von Antigen spezifischen T-Zellen zur Abwehr von Fremdartigen (Steinman 1991). Aus myeloiden Vorläuferzellen entwickeln sich CD14<sup>+</sup>-Monozyten, die entweder im Blut zirkulieren oder nach Migration ins

periphere Gewebe als Makrophagen ihre Funktion aufnehmen. Ein geringer Teil der Vorläuferzellen entwickelt sich direkt in myeloide DCs, die im Blut zirkulieren oder sich über eine CD1<sup>+</sup>-Zelle zu peripheren gewebsständigen DCs, z.B. zur Langerhans-Zelle in der Haut, differenzieren (Hart 1997).

Für die Gewinnung von DCs für *ex vivo* Untersuchungen ist eine Isolation von lymphoiden oder myeloiden DCs aus Blut möglich, jedoch ist die Zellausbeute aufgrund des kleinen DC-Anteils in PBMCs sehr gering. Dagegen eignet sich für die Gewinnung größerer Mengen an DCs vielmehr die *in vitro* Generierung aus Monozyten. Eine *in vitro* Generierung von DCs, die im Wesentlichen alle Charakteristika von unreifen *in vivo* DCs besitzt, ist durch Gabe von Granulozyten-/Makrophagen-Kolonie stimulierendem Faktor (GM-CSF) und IL-4 zu den Plastik adhärenen Monozyten für 5 Tage möglich (Romani et al. 1994). Die weitere Aktivierung zu CD83<sup>+</sup>-DCs, die eher den reifen *in vivo* DCs entsprechen, kann durch Zusatz von „Reifestimuli“, wie z.B. verschiedenen Zytokinen oder LPS, induziert werden.

#### 1.4. Physiologie dendritischer Zellen

Entscheidend für die Funktionsfähigkeit des Immunsystems ist die Unterscheidung von harmlosen und gefährlichen Signalen für den Organismus. Hierbei übernehmen DCs eine zentrale regulierende Rolle. Je nachdem, wie ein Antigen von einer DC erkannt und aufgenommen wird, kommt es zur Induktion einer Toleranzbildung oder einer abwehrenden Immunreaktion.

Dendritische Vorläuferzellen zirkulieren in der Blutbahn und verlassen als „unreife“ DCs den Blutkreislauf, um im peripheren Gewebe ihre Funktion zur Antigen-Aufnahme mittels Phagozytose oder Makropinozytose aufzunehmen. Die Aufnahme von Antigenen oder apoptotischem Zellmaterial wird über Mannose-, DEC 205- und Fc $\gamma$ -Rezeptoren (Oberflächenmarker CD16, CD32, CD64) vermittelt (Inaba et al. 1993, Sallusto et al. 1994, Steinman et al. 1995, Albert et al. 1998). In den DCs werden diese Antigene prozessiert und anschließend als kurze Peptidsequenzen in Verbindung mit den MHCs auf ihren Zelloberflächen präsentiert.

Falls die Antigen-Aufnahme und -Präsentation ohne weitere Stimuli, wie z.B. Zytokine oder CpG-Oligonukleotide erfolgt, bleibt die DC in einem „unreifen“ Zustand und hat tolerogene Eigenschaften. Es gibt regulatorische T-Zellen, die nach Kontakt mit einer unreifen DC IL-10 ausschütten und zum Energieverlust von Antigen spezifischen T-Effektor-Zellen führen (Jonuleit et al. 2000, Dhodapkar et al. 2001). Diese Toleranz-Induktion dient dem Organismus vor allem als Schutz vor Autoaggression gegen körpereigene Antigene (Hawiger et al. 2001).

Eine Aktivierung von DCs zur Induktion einer Abwehrreaktion erfolgt jedoch in der Gegenwart von mikrobiellen Pathogenen mit nachfolgender lokaler Gewebeschädigung. Es kommt dabei zur

vermehrten Ausschüttung von Zytokinen und Entzündungsmediatoren, wie z.B. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und Prostaglandin-E<sub>2</sub> (PG-E<sub>2</sub>) und somit zur Ausreifung von DCs (Banchereau et al. 2000). Bisher wurden mikrobielle Substanzen (LPS, CpG-Oligonukleotide) (Hartmann et al. 1999), freies Adenosin-Tri-Phosphat aus geschädigtem Gewebe (Schnurr et al. 2000) und die Interaktion von aktivierten T-Zellen am CD40 Liganden (Cella et al. 1996) als „Gefahrensignale“ und Stimuli zur Aktivierung von DCs identifiziert.

Wenn DCs durch einen der o.g. Mechanismen aktiviert werden, kommt es zu verminderter Antigenaufnahme und höherer Expression von kostimulierenden Molekülen, Adhäsionsmolekülen, Antigenpräsentierenden Molekülen sowie des Reifemarkers CD83. Aufgrund der höheren Expressionsdichte und -dauer dieser Oberflächenmarker ist im aktivierten „reifen“ Zustand eine optimale Antigenpräsentation gegenüber naiven T-Zellen möglich.

Viele Ansätze der zellgestützten Immuntherapie beruhen auf dem Einsatz von DCs. Um DCs immuntherapeutisch zu nutzen, ist es wichtig, die erwünschten Merkmale und Funktionen *in vitro* oder *in vivo* zu testen und zu züchten.

#### 1.5. Bakterielle Extrakte und CpG-Oligonukleotide als Aktivatoren von Immunzellen

Vor über 100 Jahren beobachtete William Coley, dass das Immunsystem in der Lage ist, Tumoren erfolgreich zu bekämpfen. Es wurde deutlich, dass sich Sarkome nach einer bakteriellen Infektion im Bereich des Tumors zurückbildeten. Coley begann 1891 mit der gezielten Injektion von Bakterien oder bakteriellen Lysaten aus Streptokokken oder Serratien (Coley 1893).

Seit den sechziger Jahren gibt es direkte Hinweise auf immunstimulatorische Wirkungen von Fremd-DNA (Jensen 1963). Bakterielle DNA-Fraktionen zeigten die höchste Aktivität. Es wurde in verschiedenen Arbeitsgruppen die Induktion der IFN- $\gamma$ -Produktion, die Aktivierung von NK-Zellen sowie die Induktion einer antitumoralen Aktivität durch Fraktionen des Bacillus Calmette-Guerin (BCG) beschrieben (Tokunaga et al. 1984, Yamamoto et al. 1988, Mashiba et al. 1990).

Es gelang, die aktiven Sequenzen, die für die immunstimulatorische Aktivierung verantwortlich gemacht wurden, innerhalb der bakteriellen DNA einzugrenzen. CpG-Oligonukleotide, die diese entsprechenden Sequenzen enthielten, konnten produziert werden. Das wichtige Motiv für die immunstimulatorische Wirkung war aus einer zentralen CpG-Gruppe zusammengesetzt, die am 5'-Ende von zwei Purinen und am 3'-Ende von zwei Pyrimidinen flankiert wird (Krieg et al. 1995). In bakterieller DNA liegen diese unmethylierten CpG-Motive in der erwarteten Frequenz von 1:16 vor. In eukaryonten DNA hingegen werden diese Cytosin-Guanin Dinukleotide supprimiert. Es kommen nur ca. 20 % der erwarteten Frequenz vor, welche zu 60 – 90 % methyliert sind (Bird et al. 1986). Die

Methylierung zerstört das stimulatorische Potential der CpG-Motive (Krieg et al. 1995), weswegen nur bakterielle DNA vom angeborenen Immunsystem als „fremd“ erkannt wird. Körper eigene DNA wird im Gegensatz zu CpG-Oligonukleotiden nicht als „Gefahrensignal“ erkannt, da die entsprechenden CpG-Motive fehlen.

Drei Klassen von synthetischen CpG-Oligonukleotiden wurden definiert: CpG-A, CpG-B und CpG-C.

**Tabelle 2:** CpG-Typen

<b>CpG-A:</b>	Immunologisch bewirken CpG-A-Oligonukleotide (Synonyme: CpG-D, Prototyp ODN 2216, Krug et al. 2001) nur geringe Effekte auf B-Zellen. Sie induzieren jedoch bei humanen plasmazytoiden DCs die Produktion großer Mengen an IFN- $\alpha$ und IFN- $\beta$ (Krug et al. 2001, Rothenfusser et al. 2002) und stimulieren PBMCs zur Sekretion von IFN- $\alpha$ und IFN- $\gamma$ (Gursel et al. 2002). Aufgrund ihrer Poly-Guanin-Sequenzen am 5'- und 3'-Ende (sogenannte Poly-G-Motive) wird die zelluläre Aufnahme (Agrawal et al. 1996, Dalpke et al. 2002, Bartz et al. 2004) und die NK-Zell-Aktivierung verbessert. Es kommt zur Up-Regulation von MHC II und kostimulierenden Molekülen (CD86, CD80, CD83, CD40) sowie zur Down-Regulation von CD14 (Krug et al. 2003). CpG-A-Oligonukleotide bewirken eine Expansion von Gedächtnis-CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen und erhöhen deren Zytotoxizität (Rothenfusser et al. 2004).
<b>CpG-B:</b>	Stimulation mit CpG-B-Oligonukleotiden (auch CpG-K, Prototyp: ODN 2006, Krieg 2002) führt zu einer spezifischen naiven T-Zell-Antwort, induziert die Ausreifung von plasmazytoiden DCs und kann B-Zellen aktivieren. Es werden jedoch nur geringe Mengen an IFN- $\alpha$ und IFN- $\beta$ von plasmazytoiden DCs ausgeschüttet (Rothenfusser et al. 2004). CpG-B-Oligonukleotide erzeugen nur schwache NK-Zell-Aktivierungen.
<b>CpG-C:</b>	CpG-C-Oligonukleotide (Prototyp: ODN M362, Hartmann et al. 2003, Marshall et al. 2003, Vollmer et al. 2004) besitzen gleichermaßen CpG-A- und CpG-B-Eigenschaften und bewirken eine robuste B-Zell-Stimulation und Ausreifung von plasmazytoiden DCs. Plasmazytoide DCs werden zur Zytokin-Produktion angeregt und es kommt zur Up-Regulation von MHC II sowie kostimulierenden Signalen (Marshall et al. 2003).

Der Toll-Like-Receptor 9 (TLR9) ist entscheidend für die Erkennung von immunstimulatorischen CpG-Sequenzen auf PBMCs. CpG-Oligonukleotide können nur solche Zellen direkt aktivieren, die den TLR9 exprimieren. Trotz einer sehr geringen TLR9-Expression auf myeloiden DCs und MoDCs sind diese nicht sensitiv auf CpG-Oligonukleotide in Abwesenheit von plasmazytoiden DCs (Hornung et al. 2002).

## 1.6. Zusammenspiel verschiedener Zytokine

Zytokine als lösliche Faktoren des Immunsystems werden von unterschiedlichen Zellen gebildet. In der folgenden Tabelle sind wichtige Zytokine zusammengefasst

**Tabelle 3:** Zusammenfassung wichtiger Zytokine (modifiziert nach Janeway/Travers, Immunologie 1995 und Horst Ibelgauf's C O P E 2006)

<u>Zytokin</u>	<u>Synthetisierende Zellen</u>	<u>Wirkungen und Funktionen</u>
IL-1 $\beta$	Monozyten, Makrophagen, Epithelzellen, (tote Zellen)	Stimulation von T-Helfer-Zellen und B-Zellen (Produktion von Immunglobulinen=Ig), Ausschüttung nach Stimulation durch LPS, bakteriellen Mitogenen, Viren und anderen Zytokinen (wie TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ etc.), Aktivierung von NK-Zellen, Zytotoxizität gegenüber bestimmten Tumorzellen
IL-2	T-, B- und NK-Zellen, Monozyten, Granulozyten	T-Zellaktivierung, klonale Expansion, Induktion von Apoptose, Differenzierung zu zytotoxischen T-Zellen, Aktivierung von NK- und B-Zellen sowie Monozyten und Granulozyten
IL-4	T-Zellen, Mastzellen	B-Zellaktivierung, Verstärkung der Produktion von IgG1 und IgE, Induktion einer T-Helferzell-Antwort vom Typ 2 (Th2-Antwort)
IL-5	T-Zellen, Mastzellen	Regulation der Expansion von Eosinophilen und Chemotaxis
IL-6	T- und B-Zellen, Makrophagen, Monozyten	Klassisches proinflammatorisches Zytokin, Akutphasereaktion; breite Effekte auf Zellwachstum und Differenzierung
IL-7	Knochenmarkstroma und Thymus-Stromazellen	T-Zellentwicklung, Regulation der peripheren T-Zellhomöostase und Expansion, Überleben von Memory-Zellen
IL-8	T-Zellen, Monozyten, Granulozyten	Mediator einer akuten Entzündung, Leukozytenaktivierung, -chemotaxis und -adhäsion
IL-10	Makrophagen, Monozyten, Mastzellen, Epithelzellen, T-Zellen, Keratinozyten	Begrenzung der Entzündung durch Effekte auf Monozyten, inhibiert IL-12 und reguliert Wachstum und Differenzierung von B-, T- und NK-Zellen sowie Mastzellen und Granulozyten
IL-12p70	B-Zellen, Granulozyten	Induktion einer Th1-Antwort, proinflammatorisches Zytokin, Induktion der Produktion von IFN- $\gamma$ und anderen Zytokinen der NK- und T-Zellen
IL-13	T-Zellen	Zellproliferation, Expression von Adhäsionsmolekülen und MHC II auf Monozyten und Makrophagen
IL-15	T-Zellen, Stromazellen, Monozyten	T-Zellproliferation und Reifung sowie Überleben von Memory-T-Zellen, unabdingbar für NK-Zellentwicklung sowie Funktion/Induktion von IFN- $\gamma$
IFN- $\gamma$	T-Zellen, natürliche Killerzellen	Zellaktivierung und Differenzierung, Verstärkung der MHC-Expression, Verstärkung der zytolytischen Aktivität
GM-CSF	Monozyten, Makrophagen, T-Zellen	Stimulation der Myelopoese und der Zellfunktion myeloider Zellen, Mobilisierung von Stammzellen, proinflammatorisch
TNF- $\alpha$	Monozyten, Makrophagen, NK-Zellen	Proinflammatorisches Zytokin, Antitumoreffekte, lokale Entzündung, Endothelaktivierung
TNF- $\beta$	T-Zellen, B-Zellen	Proinflammatorisches Zytokin, Antitumoreffekte, hemmt das Zellwachstum von B-Zellen, entzündungshemmend
MIP-3 $\alpha$	Monozyten, Makrophagen, PBMCs	Zellaktivierung von Granulozyten, neutrophile Entzündung, Fibroblasten und Makrophagen: Induktion von proinflammatorischen Zytokinen (wie z.B. IL-1, IL-6, TNF)
MIP-3 $\beta$	Monozyten, Makrophagen, PBMCs	Zellaktivierung von Granulozyten, neutrophile Entzündung

## 1.7. Zielsetzung und Herangehensweise der vorliegenden Arbeit

*In vitro* generierte DCs stellen ein besonderes Forschungsinteresse der angewandten zellulären Immunologie dar. Methoden zur *in vitro* Generierung von funktionell nutzbaren DCs und deren genaue Charakterisierung werden als Voraussetzung für eine Erfolg versprechende Anwendung von DCs in der Klinik gesehen. Im Mittelpunkt der vorliegenden Dissertation standen *in vitro* generierte DCs, die von bestimmten Ausreifungsstimuli (konditionierten Medien) beeinflusst wurden. Die konditionierten Medien wurden zuvor aus PBMC-Kulturüberständen unter Zusatz von immunstimulierenden bakteriellen Extrakten oder CpG-Oligonukleotiden gewonnen. Ziel der Arbeit war es, die so gewonnenen DCs zu charakterisieren und herauszufinden, ob unter dieser DC-Ausreifung phänotypisch und funktionell interessante DC-Populationen entstehen.

In einem systematischen Vergleich sollten die so generierten DC-Populationen anhand ihrer phänotypischen Eigenschaften im Oberflächenmarkerprofil untersucht werden. Auch die funktionellen Merkmale wie Zellproliferationen, spezifische CD8<sup>+</sup>-Reaktionen oder die Fähigkeit zur Antigenaufnahme wurden analysiert. Eine weitere Frage war, welche unterschiedlichen Zytokinzusammensetzungen in den konditionierten Medien bzw. DC-Zellkulturen existierten und somit mitverantwortlich für die Heterogenität der verschiedenen DC-Subpopulationen waren.

Wir wollten in dieser Arbeit Alternativen zu den bisherigen Verfahren zur *in vitro* Generierung von klinisch einsetzbaren humanen DCs entwickeln. Die *in vitro* gewonnenen DCs sollten in diesem Projekt bezüglich ihrer funktionellen Qualität, der methodischen Durchführbarkeit und der Kosteneffizienz systematisch verbessert werden.

## 2. Material

---

### 2.1. Labormaterialien

- 50 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nürnberg)
- Cryoröhrchen 1,8 ml (Nunc, Roskilde, Dänemark)
- Eppendorf-Röhrchen (Reaktionsgefäße, Eppendorf, Deutschland)
- Einfachblutbeutel (Compoflex, Fresenius HemoCare, Bad Homburg) mit 70 ml CPDA-Stabilisator
- Falcon 14 ml Rundbodenröhrchen, Polypropylen (Becton Dickinson Labware, USA)
- Falcon 5 ml Rundbodenröhrchen, Polystyrol (Becton Dickinson Labware, USA)
- Filtereinheit 0,2 µm Celluloseacetat (Schleicher&Schuell Microscience, Dassel)
- Nalgene Cryo 1 °C Freezing Container (Nunc, Roskilde, Dänemark)
- Schüttler (Phero Shaker, Biotec-Fischer)
- Vortexer (VF 2, IKA Labortechnik)
- Zellkulturflaschen 75 cm<sup>2</sup> (Sarstedt, Nürnberg)
- Zellkulturplatten 6-Well, 24-Well, 48-Well (Nunc, Roskilde, Dänemark)
- Zellkulturplatten 96-Well Rundboden oder Flachboden (Nunc, Roskilde, Dänemark)

### 2.2. Reagenzien

#### 2.2.1. *Grundsubstanzen und Lösungen*

- Aqua-Spüllösung DeltaSelect
- Biocoll Separating Solution (Biochrom AG, Berlin)
- Bovines Serumalbumin BSA (Sigma, München)
- EDTA (Sigma, München)
- Dimethylsulfoxid (Sigma, München)
- Humanes IgG Flebogamma (Grifols GmbH, Langen)
- Trypan-Blau-Lösung (Fluka)



### 2.2.2. Zytokine und Chemokine

- GM-CSF (Leucomax, Essex Pharma, München)
- IL-2 (Proleukin, Chiron Corporation, USA)
- IL-1 $\beta$  (CellGenix, Freiburg)
- IL-4 (CellConcepts, Umkirch)
- IL-6 (CellGenix, Freiburg)
- PG-E<sub>2</sub> (Minprostin, Pharmacia GmbH, Erlangen)
- TNF- $\alpha$  (CellGenix, Freiburg)

### 2.2.3. Peptide

NMI Peptides, NMI Technologietransfer GmbH, D-72770 Reutlingen

- Influenza-Peptid      AA-Sequenz GILGFVFTL      (FLU), Bindungstyp: HLA.A201
- K-ras-12V-Peptid      AA-Sequenz KLVVVGAVGV      (12V), Bindungstyp: HLA.A201
- HIV-Peptid      AA-Sequenz SLYNTVATL      (HIV), Bindungstyp: HLA.A201

### 2.2.4. Puffer

- PBS-Dulbecco = Phosphate buffered saline (Biochrom AG, Berlin)
- FACS-Puffer = PBS + 2 % humanes IgG (Flebogamma, Grifols GmbH, Langen)

### 2.2.5. Zellkulturmedien

Zellkulturmedium

- 500 ml Iscove's Medium (Gibco, Invitrogen GmbH) mit L-Glutamin, 25 mM HEPES Puffer und 3,024 mg/l Natriumbikarbonat, ohne Phenolrot
- 50 ml humanes AB-Serum (Sigma, München)
- 5 ml Penicillin/Streptomycin (Gibco, Invitrogen GmbH)

RPMI-Medium

- 500 ml RPMI 1640 Medium (Biochrom AG, Berlin) mit 0,532 g/l L-Glutamin und 2 g/l Natriumbikarbonat mit Phenolrot
- 50 ml fötales Kälberserum (FCS) (Gibco, Invitrogen GmbH)
- 8 ml 1M HEPES Puffer (Biochrom AG, Berlin)

- 5 ml Penicillin/Streptomycin (Gibco, Invitrogen GmbH)

### 2.2.6. CpG-Oligonukleotide

Firma COLEY Pharmaceutical Canada, Kanata, Ontario, Canada 3 µg/ml mit zugehöriger Nukleotidsequenz:

- CpG-A: N°: 2336, G\*G\*G-G-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-G-G\*G\*G\*G\*G\*G
  - CpG-B: N°: 2006, T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\*G\*T\*T
  - CpG-C: N°: 2395, T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*C\*G\*G\*C\*G\*C\*G\*C\*G\*C\*C\*G
  - CpG N°: 2137 Kontrolle zu 2006: T\*G\*C\*T\*G\*C\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*G\*C\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*G\*C\*T\*T
  - CpG N°: 2243 Kontrolle zu 2216: G\*G\*G-G-G-A-G-C-A-T-G-C-T-G\*G\*G\*G\*G\*G\*G\*G
- \*Phosphorothioatbindung, –Phosphodiesterbindung

### 2.2.7. Bakterielle Extrakte

- Begrivac<sup>®</sup> 2003/2004 (9 µg Influenza Antigen/100 µl, Chiron Behring, Marburg)
- Symbioflor 1<sup>®</sup> (1,5 - 4,5 x 10<sup>7</sup> Enterococcus faecalis/ml, Symbiopharm, Herborn-Hörsbach)

### 2.2.8. Antikörper und Reagenzien für die Durchflusszytometrie

**Tabelle 4:** Dendritische Zellmarker: B&D, Heidelberg

NAME	FARBSTOFF	KLON	ISOTYP
CD123	PE	7G3	IgG2a
CD14	FITC	M5E2	IgG2a
CD16	PE	3G8	IgG1
CD206	APC	19.2	IgG1
CD209	FITC	DCN46	IgG2b
CD32	FITC	FLI8.26	IgG2b
CD40	APC	5C3	IgG1
CD64	FITC	10.1	IgG1
CD80	FITC	L307.4	IgG1
CD83	PE	HB15e	IgG1
CD86	PE	IT2.2	IgG2b
HLA-DR	PE	TÜ36	IgG2b

- *Endozytose-Assays:* Dextran-FITC MW 40 kD (25 mg, Molecular Probes, Kat.#D-1845, lyophilisiert)

**Tabelle 5:** T-Zell-Marker: B&D, Heidelberg:

<i>NAME</i>	<i>FARBSTOFF</i>	<i>KLON</i>	<i>ISOTYP</i>
CD3	Per-CP	SK7	IgG1
CD4	PE	RPA-T4	IgG1
CD8	APC	SK1	IgG1
HLA-A2	FITC	BB7.2	IgG2b
IFN- $\gamma$	FITC	25723.11	IgG2b

**Tabelle 6:** Monoklonale Mausimmunoglobulin-Isotyp-Kontrollen: B&D, Heidelberg:

<i>NAME</i>	<i>FARBSTOFF</i>	<i>KLON</i>
IgG1	FITC	MOPC-21
IgG1	PE	MOPC-21
IgG1	APC	MOPC-21
IgG2a	FITC	G155-178
IgG2a	PE	G155-178
IgG2b	FITC	27-35
IgG2b	PE	27-35

### 2.2.9. Andere FACS-Reagenzien

- FACS Permeabilization Solution (B&D, Heidelberg)
- FACS Lysing Solution (B&D, Heidelberg)
- Brefeldin A (BFA) (Sigma, München)
- Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) (Sigma, München)
- Ionomycin (Sigma, München)

### 2.3. Kits und Arrays

- T-Zell-Negativ-Isolationskit (DynaL Biotech GmbH, Hamburg)
- Vybrant CFSE Cell Tracer Kit (Molecular Probes Inc., USA)
- RayBio Human Cytokine Antibody Array (RayBiotech, Inc.)

#### 2.4. Geräte

- CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank (Heraeus, Hanau)
- Durchflusszytometer FACSCalibur (B&D, Heidelberg) mit CellQuest Software (B&D, Heidelberg)
- Magnet Dynal MPC-L (Dynal Biotech GmbH, Hamburg)
- Neubauer-Zählkammer
- Mikroskop ID 03 (Carl Zeiss, Deutschland)
- Sterilbank Microflow Class 2 Biological Safety Cabinet
- Tischzentrifuge
- Wasserbad Polytherm 1,5 (Dinkelberg GmbH, Gablingen)
- Zentrifuge Laborfuge 400e (Kendro Laboratory Products, Newtown, USA)
- Chemolumineszenz-Kamera (Las 1000 Pro V2.5, Raytest Germany, Fujifilm) mit Aida Image Analyzer v3.21 Software

### 3. Methoden

---

#### 3.1. Isolierung von PBMCs aus peripherem Blut und Buffy Coats

Für die Gewinnung von PBMCs wurden von gesunden Blutspendern ca. 300 ml bis 400 ml Vollblut oder deren Buffy Coats entnommen (Einfachblutbeutel, Compoflex). Die Blutentnahme fand in der hämatologischen Ambulanz bzw. in der Transfusionsmedizin unter sterilen Bedingungen in der Charité - Campus Benjamin Franklin statt.

Es wurden Tubes mit jeweils 10 ml Biocoll Lösung vorbereitet, daraufhin das 1:1 mit PBS gemischte Blut langsam und vorsichtig darüber geschichtet (Ficollpräparation, spezifische Dichte 1,077 g/ml) und anschließend bei 20 °C, 400 g für 30 bis 40 min (ohne Zentrifugenbremsung) zentrifugiert.

Die mononukleären Zellen reicherten sich im Gradienten zwischen der dichteren Biocoll-Lösung und dem weniger dichten Blutplasma an. Die PBMC-Schicht, die sich als zarte Wolke über der Biocoll Lösung abbildete, wurde abpipettiert und dreimal mit PBS gewaschen.

#### 3.2. Zellzählung, Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Die gewonnenen PBMCs wurden mit Trypanblau-Lösung angefärbt, welche in defekte Zellen eindringt und somit die toten Zellen blau kennzeichnet. In einer Neubauer-Zählkammer wurden die lebenden Zellen, die sich als helle Zellen hervorhoben, gezählt. Je nach Bedarf wurden die PBMCs für die Ausreifung von DCs auf die entsprechende Zellkonzentration eingestellt und weiter verwendet.

Zur Aufbewahrung lagerten die Zellen bis zur schließlichen Verwendung in flüssigem Stickstoff bei -196 °C. Das dafür genutzte Einfriermedium bestand aus 90 % AB-Serum und 10 % Dimethylsulfoxid. Dimethylsulfoxid hemmt die Kristallbildung im Zellplasma und verhindert somit die Zerstörung von Zellstrukturen beim Einfrieren. Es folgten die Resuspendierung und Übertragung in Kryoröhrchen von 2 – 10 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml Einfriermedium. Nach sofortigem Transfer in eine mit Isopropanol gefüllte Einfrierbox (Nalgene), die eine langsame und gleichmäßige Tieffrierung bei -80 °C gewährleistete, konnten die Kryotubes nach einem Tag in den Stickstofftank übertragen werden.

Zum Auftauen wurden Zentrifugenröhrchen (Falcon-14-ml-Tubes) mit 7 ml Medium und 1 ml AB-Serum vorbereitet. Nach der Entnahme der Zellen aus dem flüssigen Stickstoff wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad aufgetaut, anschließend zentrifugiert, mit Medium oder PBS gewaschen und für das weitere Vorgehen auf eine geeignete Zellsuspension eingestellt. Die Zellen wurden bereits einen Tag vor den geplanten Experimenten aufgetaut und im Brutschrank aufbewahrt, um so ausreichend Zeit für die

Adaptation und die Wiederherstellung der Zellfunktionen zu gewährleisten.

### 3.3. Herstellung von konditionierten Medien

Für die Ausreifung unreifer DCs (immature monocyte derived DCs = imMoDCs) zu reifen DCs (mature monocyte derived DCs = mMoDCs) wurden verschiedene konditionierte Medien mit Zusätzen wie CpG-Oligonukleotiden oder bakteriellen/viralen Extrakten in PBMC-Kurzkulturen produziert. Dafür verwendeten wir frisch gewonnene oder in Stickstoff tiefgefrorene PBMCs. Nach Waschvorgängen, Zellzählung und Einstellung auf eine geeignete Zellsuspension erfolgte die Zugabe von jeweils  $2 \times 10^7$  PBMCs pro Well in eine 6-Well-Platte in 4 ml Kulturmedium. Anschließend wurden CpG-Oligonukleotide (ODN No 2336 = CpG-A, ODN No 2006 = CpG-B, ODN No 2395 = CpG-C, ODN No 2137 als Kontrolle, ODN No 2243 als Kontrolle) in einer Konzentration von 3 µg/ml hinzugegeben und für 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Desweiteren gaben wir unstimuliertes Medium als Kontrolle zu den PBMCs hinzu. Danach wurden alle PBMCs mitsamt den Überständen abgeerntet und für 10 min bei 300 g zentrifugiert. Dadurch entstanden die verschiedenen konditionierten Medien (CM): UM (aus unstimuliertem Medium), CpG-A-CM, CpG-B-CM, CpG-C-CM und deren Kontrollen.

Weiterhin produzierten wir ein konditioniertes Medium von bakteriellen/viralen Extrakten aus Begrivac<sup>®</sup> und Symbioflor<sup>®</sup>. Dabei wurden ebenfalls  $2 \times 10^7$  PBMCs in 4 ml Kulturmedium mit einem Zusatz von 9 µg Begrivac<sup>®</sup> (2003/2004, 9 µg Influenza Antigen/100 µl, Chiron Behring, Marburg) bzw.  $1 \times 10^7$  bact. = 1 ml Symbioflor 1<sup>®</sup> ( $1,5 - 4,5 \times 10^7$  Enterococcus faecalis/ml, Symbiopharm, Herborn-Hörbach) für 48 h bei 37 °C inkubiert, anschließend zentrifugiert und der Überstand in Aliquots eingefroren.

Pro Bedingung wurden Überstände von 3 verschiedenen Spendern getrennt angesetzt, anschließend innerhalb einer Bedingung gemischt, steril gefiltert (Porengröße 0,22 µm) und in Aliquots à 0,5 ml bei -20 °C eingefroren.

### 3.4. Adhärenztrennung und Kultur von DCs

PBMCs wurden für die Isolierung von Monozyten in einer Zellkulturflasche (Firma Sarstedt, 75 cm<sup>2</sup>) angesetzt. Diese Methode bediente sich der Eigenschaft von Monozyten, an Plastikoberflächen zu adhären. Für eine Kulturflasche setzten wir  $2 \times 10^7$  PBMCs in 3 ml Medium (Firma Gibco) zur Adhärenztrennung ein. Nach einer zweistündigen Adhärenzzeit wurden die nicht adhärenierenden Zellen (NACs) mit Medium oder PBS vorsichtig abgespült und für weitere Verwendungen (z.B. für den Ansatz einer spezifischen T-Zellkultur) eingefroren.

Die adhärenenten Monozyten inkubierten für 5 Tage mit GM-CSF (100 ng/ml) und IL-4 (50 ng/ml) bei 37

°C zur Differenzierung zu imMoDCs. Anschließend wurden die imMoDCs mit den verschiedenen Reifestimuli inkubiert: nach Zugabe vom Zytokin-Cocktail (CC: Kombination aus PG-E<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) bzw. den konditionierten Medien (CpG-CM/BeCM+SyCM) reiften die imMoDCs innerhalb von 2 Tagen zu mMoDCs aus.

### 3.5. Durchflusszytometrische Phänotypisierung

#### 3.5.1. *Extrazelluläre FACS-Färbung mit Oberflächenantikörpern*

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Differenzierung von Zellen nach deren Granularität und Zellgrösse sowie nach der spezifischen Bindung von Fluoreszenz markierten Antikörpern gegen definierte Oberflächenantigene. Anhand von DC-Oberflächenmarkern und deren spezifisch bindenden Fluoreszenz markierten Antikörpern erfolgte eine Immunphänotypisierung der unterschiedlich ausgereiften DCs. Dafür wurden die folgenden Antikörper ausgewählt: CD14, CD16, CD32, CD40, CD64, CD80, CD83, CD86, CD123, CD206, CD209, HLA-DR sowie die zugehörigen Isotypenkontrollen. Isotypenkontrollen sind Antikörper des gleichen Subtyps, die nicht an menschlichen Antigenen binden. Sie wurden bei der Auswertung der Proben als Leerwert abgezogen. Durch die Verwendung von Antikörpern mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (FITC = Fluorescein Isocyanat, PE = Phycoerythrin, APC = Allophycocyanin oder PerCP = Peridin Chlorophyll-a Protein) war es möglich, Zweifach- und Dreifachfärbungen vorzunehmen. Dabei wählten wir das folgende Kombinationsschema:

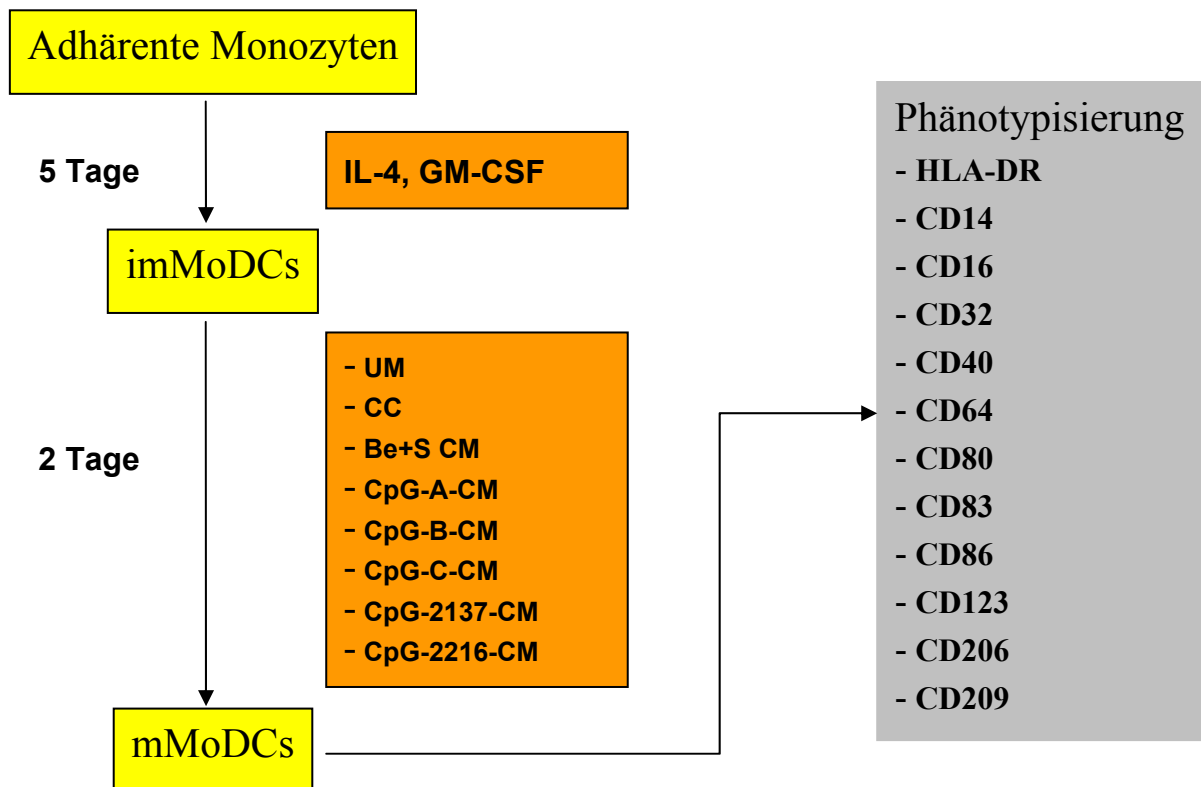
**Tabelle 7:** Mehrfachfärbungen durch Kombination extrazellulärer Antikörper

No	FITC	PE	APC
1	CD14	HLA-DR	CD206
2	CD80	CD86	CD40
3	CD32	CD123	
4	CD209	CD16	
5	CD64	CD83	
6	Isotyp 1	Isotyp 2b	
7	Isotyp 2a	Isotyp 1	
8	Isotyp 2b	Isotyp 2a	Isotyp 1

Für die FACS-Färbungen wurden pro Tube  $1 \times 10^5$  DCs mit den entsprechenden Antikörpern bei 4 °C angefärbt. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit bei 4 °C und Dunkelheit wurden alle Tubes mit FACS-Puffer zwei- bis dreimalig gewaschen und zentrifugiert. Durch eine Fixierung in 37 % Formalin-Lösung gelang es, die Zellen haltbar zu machen und innerhalb der nächsten Tage zu messen.

### 3.5.2. Durchflusszytometrische Messungen

Die durchflusszytometrische Messung erfolgte am FACSCalibur (B&D, Heidelberg) mithilfe der Software CellQuest (B&D, Heidelberg). Es wurden jeweils  $1 \times 10^4$  Ereignisse gemessen. Zwischen den Messungen wurde mit Wasser gespült, um das Übertragen von Artefakten zu minimieren. Für Zweifach- und Dreifachfärbungen haben wir die überlappenden Emissionsspektren (PE, FITC, APC) anhand von Proben mit Mehrfachfärbungen vor der eigentlichen Messung am Durchflusszytometer kompensiert.



**Abbildung 1:** Aus adhärenente Monozyten wurden nach 5 Tagen unter Zugabe von GM-CSF und IL-4 imMoDCs. Für weitere 2 Tage wurden die konditionierten Medien zur Kultur hinzugegeben und anschließend mMoDCs für phänotypische und funktionelle Versuche vorbereitet.



### 3.5.3. Bestimmung HLA-A2 positiver Blutspender

PBMCs von mehreren gesunden Blutspendern wurden aus Vollblut oder deren Buffy Coats über eine Ficoll-Dichtezentrifugation isoliert. Für die extrazelluläre Anfärbung wurden ca.  $10^5$  PBMCs mit HLA-A2 FITC und in einem anderen Röhrchen die zugehörige Isotypenkontrolle Iso2b FITC angefärbt.

### 3.6. CFSE-Proliferationsassays

Die Grundlage der gemischten Lymphozytenkultur ist die Interaktion von Leukozyten zweier verschiedener Individuen: T-Lymphozyten des einen Individuums erkennen via T-Zell-Rezeptor ein Fremd-MHC-Molekül einer Antigen präsentierenden Zelle eines anderen Individuums. Daraufhin werden die T-Lymphozyten zur Proliferation angeregt. Als *Stimulatorzellen* verwendeten wir die DCs von HLA-A2 positiven Spendern. Lymphozyten (Pan-T-Zellen) von HLA-A2 negativen Spendern dienten als *Responderzellen*. Die intrazelluläre Färbung mit Carboxyfluorescein-Succimidyl-Ester (CFSE) ist eine einfach durchführbare Methode, um die Proliferation von T-Zellen zu bestimmen.

#### 3.6.1. Isolation von Pan-T-Zellen aus PBMCs

Für die gemischte Lymphozytenkultur wurden T-Lymphozyten (Pan-T-Zellen) mittels T-Zell-Negativ-Isolationskit (DynaL Biotech GmbH, Hamburg) aus PBMCs isoliert. Das Prinzip des Verfahrens ist eine Antikörpermarkierung der unerwünschten Zellen mit anschließender Kopplung der gebundenen Antikörper an magnetische Partikel. Mithilfe eines starken Magneten (DynaL MPC-L) wurden die unerwünschten, magnetpartikelgebundenen Zellen an der Wand eines Zentrifugenröhrchens fixiert und die erwünschten, ungebundenen Zellen mit dem Medium abgenommen.

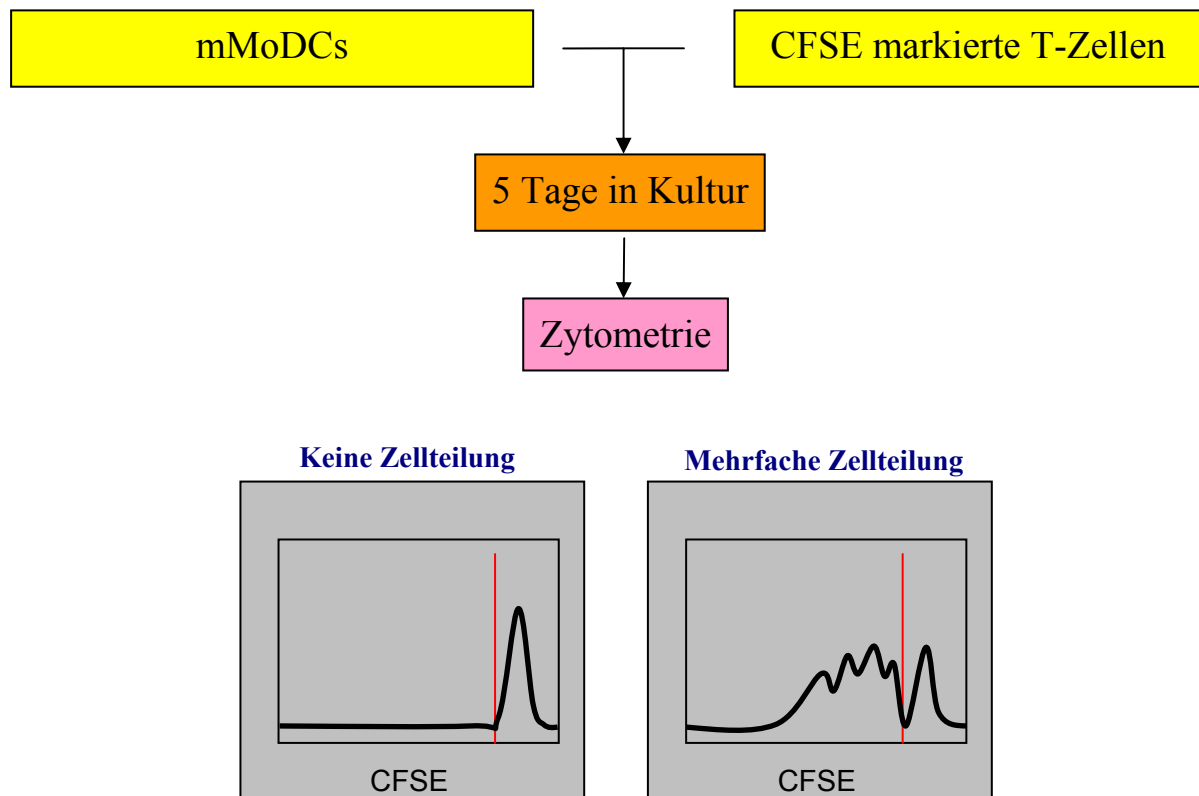
Zunächst resuspendierten wir  $1 \times 10^7$  PBMCs in 100  $\mu$ l PBS/0,1% BSA in einem Falcon-Rundbodenröhrchen und versetzten sie mit 20  $\mu$ l FCS sowie 20  $\mu$ l Antikörpermix (monoklonale Mausantikörper gegen CD14, HLA-Klasse II DR/DP, CD56 und CD16 für T-Zellisolation). Nach 15-minütiger Inkubation bei 4 °C und anschließendem Waschen (mit 2 ml PBS/0,1 % BSA) zentrifugierten wir die Proben für 8 min bei 500 g, um die überschüssigen Antikörper zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 0,8 ml PBS/0,1 % BSA resuspendiert und mit 0,2 ml der zuvor in PBS/0,1 % BSA gewaschenen Magnetpartikel (Dynabeads) versetzt. Während der 15-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur und gleichmäßigem Drehen banden die Beads an die zellgebundenen Oberflächenantikörper unter Bildung von Zell-Magnetpartikel-Rosetten. Nach vorsichtigem Pipettieren wurden diese gelöst und das Tube in ein starkes Magnetfeld überführt (DynaL-MPC-L-Magnet). Dabei koppelten unerwünschte Zellen wie B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und

Erythrozyten an die Beads. Nach 2 min Verweildauer im magnetischen Feld hafteten diese an der Röhrenhinterwand. Die nicht markierten Pan-T-Zellen befanden sich nun im Überstand und konnten abgenommen werden. Um eine hohe Zellreinheit zu gewährleisten, wurden die Arbeitsschritte ab Zugabe der Magnetpartikel wiederholt. Die Zellen wurden schließlich nochmals gewaschen, gezählt und die Reinheit in einer kleinen Probe durchflusszytometrisch überprüft.

### *3.6.2. Proliferation von allogenen T-Zellen in der gemischten Lymphozytenkultur*

Als Prinzip zur Messung der Proliferationsraten von Lymphozyten wird die Eigenschaft des Farbstoffes CFSE genutzt, sich an intrazytoplasmatische Proteine kovalent zu binden. CFSE ist ein farbloses Reagenz und diffundiert passiv in die Zellen. Im Cytoplasma werden die Azetatreste durch Esterasen abgespalten, wodurch der Fluoreszenzfarbstoff CFSE entsteht. Das Molekül kann die Zellmembran nicht passieren und bindet an intrazelluläre Proteine. Jede Zelle hat dann eine Färbung ähnlicher Intensität. Im Falle einer Zellteilung wird an jede Tochterzelle die Hälfte des Farbstoffs weitergegeben. Die Intensität verringert sich somit bei jeder Zellteilung um die Hälfte. Diese Abnahme kann durchflusszytometrisch erkannt und somit die Anzahl der Zellteilungen einer markierten Zelle festgestellt werden.

Unter Verwendung des Vybrant CFSE Cell Tracer Kits (Molecular Probes Inc., USA) wurden nach Angaben des Herstellers zunächst  $1 - 2 \times 10^6$  Pan-T-Zellen von HLA-A2 negativen Spendern für 15 min in 2 ml Medium mit  $2,5 \mu\text{M}$  CFSE bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach dem Waschen in 10 ml PBS erfolgte eine Inkubation der Pan-T-Zellen in 1 ml Medium im Brutschrank. Anschließend wurden in einer 96-Well-Platte jeweils  $5 \times 10^4$  DCs und  $1 \times 10^5$  CFSE gefärbte Pan-T-Zellen in  $200 \mu\text{l}$  Medium angesetzt. Die Ausführung erfolgte jeweils dreifach pro Bedingung (Triplets) und es wurden Zellen von 2 verschiedenen HLA-A2 negativen Pan-T-Zell-Spendern eingesetzt. Nach einer 5-tägigen Kultur ernteten wir die Zellen und bereiteten sie nach Waschvorgängen (in FACS Puffer) für die Durchflusszytometrie vor.



**Abbildung 2:** mMoDCs wurden zusammen mit CFSE markierten T-Zellen in Kultur gebracht und nach 5 Tagen durchflusszytometrisch analysiert. Pro Zellteilung sinkt der Anteil der CFSE Mengen in jeder Zelle, wodurch die Proliferationsraten sichtbar werden.

### 3.7. Spezifische Kokultur von NACs mit Antigen beladenen DCs

DCs sind in der Lage, Antigen spezifische T-Zell-Antworten hervorzurufen. Diese Eigenschaft testeten wir in einer Kokultur von autologen NACs (darunter  $CD8^+$ -T-Lymphozyten) als *Responderzellen* und Antigen beladenen mMoDCs als *Stimulatorzellen*. Dabei verwendeten wir das Influenzapeptid FLU für eine Memory-Antwort und das mit dem Pankreaskarzinom assoziierte K-ras-12V-Peptid für eine naive T-Zell-Antwort.

#### 3.7.1. *Expansion von spezifischen $CD8^+$ -Lymphozyten*

Für den Kulturansatz wurden die mMoDCs und NACs auf eine geeignete Zellsuspension (mMoDCs:  $4 \times 10^5/\text{ml}$  und NACs:  $4 \times 10^6/\text{ml}$ ) eingestellt. Die Beladung der DCs mit den entsprechenden Peptiden ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) erfolgte für 2 h bei  $37^\circ\text{C}$ . In einer 48-Well-Platte wurden pro Well jeweils  $2 \times 10^6$  NACs und  $2 \times 10^5$  mMoDCs in insgesamt 1 ml Medium zusammen kultiviert. Wir versorgten die Kultur ab Tag 1 alle 2 Tage jeweils mit 300 Einheiten (U) IL-2. Am Tag 10 wurden alle Kokulturen geerntet und für die intrazelluläre IFN- $\gamma$ -Färbung vorbereitet.

### 3.7.2. Intrazelluläre FACS-Färbung

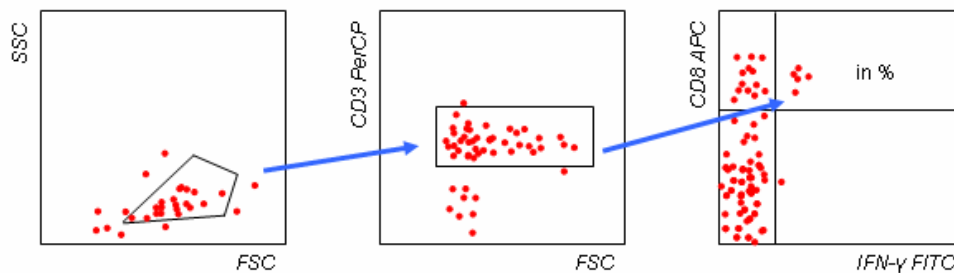
Für die Detektion reaktiver CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten innerhalb der spezifischen Kokultur (von NACs mit Antigen beladenen DCs) färbten wir intrazelluläres IFN- $\gamma$  an, das nach Aktivierung durch T2-Zellen von CD8<sup>+</sup>-spezifischen Zellen produziert wurde. Dafür wurden T2-Zellen 2 h mit 10 mg/ml Peptid inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Die NACs versetzten wir im Verhältnis 10 : 1 mit den Peptid beladenen T2-Zellen in 2 ml Medium in Falcon-Rundbodenröhrchen und inkubierten sie für eine Stunde bei 37 °C. Als Positivkontrolle diente ein Ansatz von NACs mit 25 ng/ml Phorbol-1,2-myristat-1,3-acetat und 1  $\mu$ g/ml Ionomycin in 2 ml Medium. Anschließend wurde jede Probe mit 10  $\mu$ g Brefeldin A (BFA) versetzt und für 5 h im Brutschrank inkubiert. BFA blockiert den Golgi-Apparat, wodurch der Export von Zytokinen aus den Zellen verhindert wird. Infolgedessen reichert sich in den aktivierten CD8<sup>+</sup>-Zellen IFN- $\gamma$  intrazellulär an. Nach Waschvorgängen und Zugabe von 1 ml 1 mM EDTA-Lösung für 10 min bei 37 °C wurde die Stimulation gestoppt. Nachdem wir die Zellen in FACS-Puffer bei 4 °C gewaschen und zentrifugiert hatten, erfolgte nun die Anfärbung mit 5  $\mu$ l extrazellulären Antikörpern (CD3 PerCP, CD8 APC) und anschließender Inkubation auf Eis im Dunkeln. Nach Zugabe von 2 ml FACS Lysing Solution wurden die Proben zentrifugiert und mit 500  $\mu$ l FACS Permilyzing Solution versetzt, geschüttelt und für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend zentrifugierten wir die Proben und der intrazelluläre Antikörper, welcher intrazellulär akkumuliertes IFN- $\gamma$  anfärbt (10  $\mu$ l IFN- $\gamma$  FITC), wurde zugefügt (Inkubationszeit von 30 min auf Eis im Dunkeln). Nach dem letzten Waschvorgang erfolgte die abschließende Fixierung der gefärbten Zellen mit je 100  $\mu$ l PBS + 1 % Formalin.

Für die spätere FACS-Messung wurden zusätzlich ungefärbte und einfach gefärbte Proben für die Einstellung und Kompensation der interferierenden Fluoreszenzen am Durchflusszytometer vorbereitet.

### 3.7.3. Durchflusszytometrische Messung der spezifischen Peptid-Kultur

Die Proben wurden im Durchflusszytometer (FACSCalibur) gemessen und mit der zugehörigen Software ausgewertet. Jede Probe wurde mit einer maximalen Geschwindigkeit von nicht mehr als 1000 Zellen pro Sekunde (insgesamt 100 000 Ereignisse pro Probe) eingelesen.

Wir werteten die Proben folgendermaßen aus: Im Forward-/Side-Scatter-Diagramm wählten wir die Lymphozytenregion aus und grenzten davon die CD3<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten ab. Die Darstellung der Lymphozyten im CD3/CD8-Diagramm zeigte die doppelt-positive Population im oberen rechten Quadranten. Diese Zellen wurden nach IFN- $\gamma$ -Expression und CD8<sup>+</sup>-Expression dargestellt. Die Frequenz der reaktiven T-Lymphozyten wurde als Prozentzahl der CD3<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen ausgedrückt.

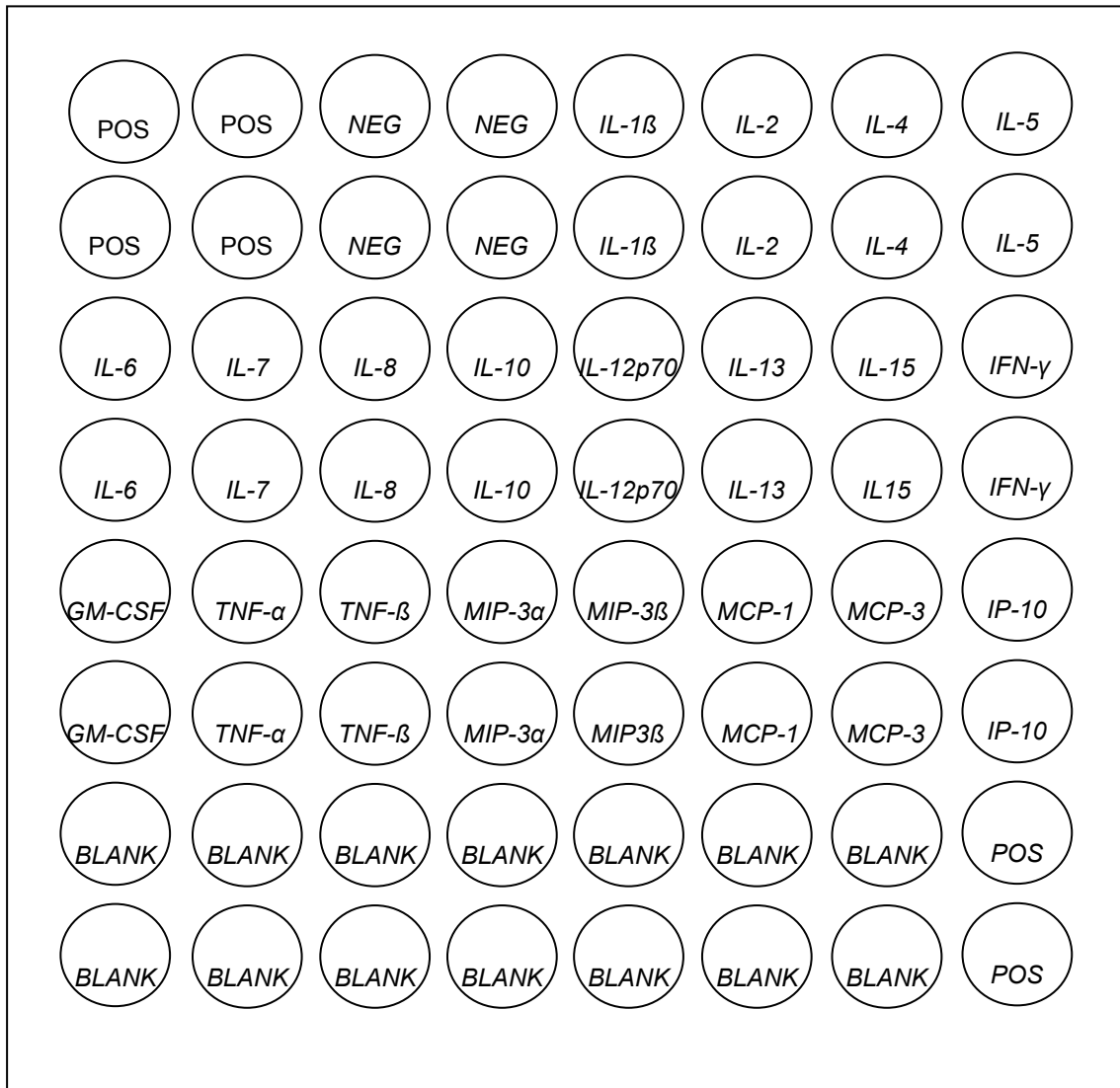


**Abbildung 3:** Im Forward/Side-Scatter-Diagramm wurde die Lymphozytenpopulation eingegrenzt, wovon wiederum die CD3<sup>+</sup>-Zellen durch ein Rechteck abgegrenzt wurden. Die IFN- $\gamma$  sezernierenden CD8<sup>+</sup>-Zellen konnten davon im rechten oberen Quadranten prozentual dargestellt werden.

### 3.8. Zytokinanalysen

Zytokine spielen eine wesentliche Rolle im Immunsystem, u.a. für Apoptose, Angiogenese sowie für Zellwachstum und –differenzierung. Mithilfe der RayBio Human Cytokine Antibody Arrays<sup>®</sup> war es möglich, verschiedene Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , MIP-3 $\alpha$ , MIP-3 $\beta$ , MCP-1, MCP-3, IP-10) aus den konditionierten Medien sowie aus den Überständen der DC-Kulturen zu detektieren. Dabei waren vor allem die von UM, BE-CM, Sy-CM, CpG-A-CM und CpG-B-CM von Interesse, da bereits in der Phänotypisierung charakteristische Unterschiede zu erkennen waren. Zusätzlich wurden die Kulturüberstände der verschiedenen mMoDCs analysiert. Wir vermischten jeweils Überstände von 3 verschiedenen Spendern, um individuelle Unterschiede auszugleichen.

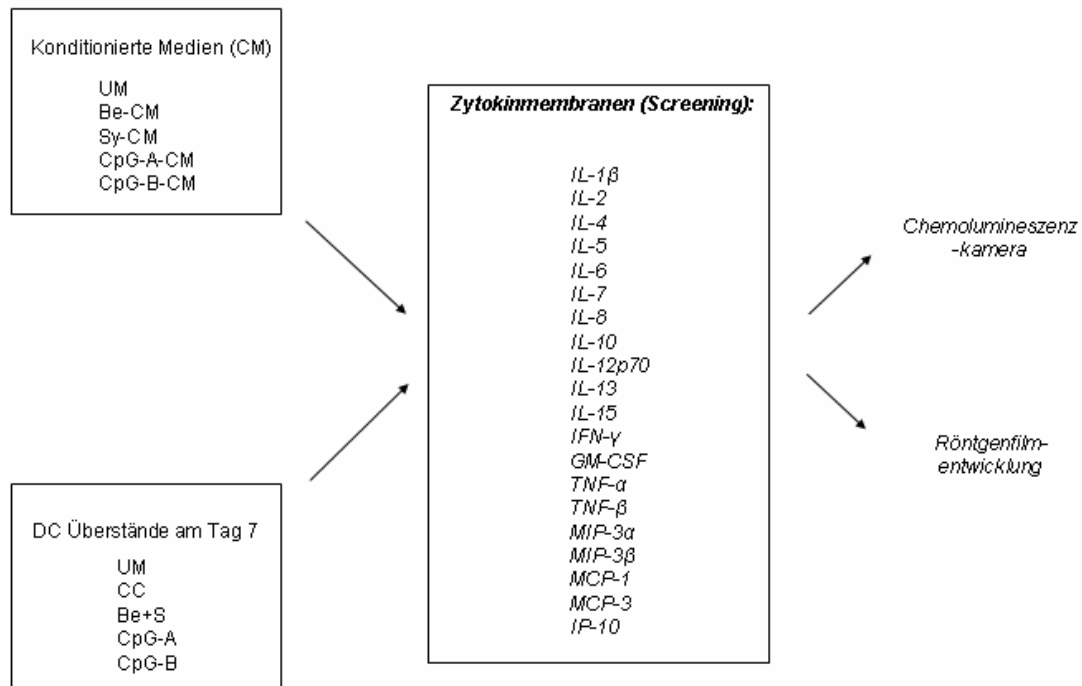
Die Versuche wurden nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Zunächst versetzten wir die Zytokin-Membranen in der vorgesehenen 8-Well-Platte für 30 min mit Blocking Buffer bei Raumtemperatur unter vorsichtigem Schütteln. Nachdem der Blocking Buffer abpipettiert wurde, erfolgte die Zugabe der entsprechenden konditionierten Medien. Nach einer 1-2 stündigen Inkubationszeit bei vorsichtigem Schwenken auf dem Schüttler wurden die konditionierten Medien wieder abgenommen. Es folgten drei Waschvorgänge à 5 min mit 2 ml Wash Buffer I und zwei Waschvorgänge mit Wash Buffer II. Anschließend gaben wir den 1. Antikörper (Biotin-konjugierter Antikörper) dazu, welcher für 1 - 2 h bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Der 2. Antikörper (HRP-konjugierter Antikörper) wurde aufgetragen und ebenfalls für 1 – 2 h inkubiert. Für die Detektion wurden jeweils 500  $\mu$ l Detection Buffer A + 500  $\mu$ l Detection Buffer D zugegeben, welche bei Raumtemperatur für 10 - 20 min inkubierten.



**Abbildung 4:** Schema der Zytokinmembranen: Für die Zytokinmessungen wurden Zytokinmembranen (Ray Biotech®) mit jeweils 20 ausgesuchten relevanten Zytokinen hergestellt. Anschließend wurden die Signale per Chemolumineszenz detektierender Kamera bzw. Röntgenfilmentwicklung analysiert.

Die Signale wurden sowohl über eine Chemolumineszenz-Kamera als auch über Röntgenaufnahmen erfasst. Die Detektion in der Chemolumineszenz-Kamera erfolgte für ca. 60 s und wurde mit der zugehörigen Aida®-Software ausgewertet.

Die Röntgenfilme wurden in der Dunkelkammer auf die vorbereiteten Membranen für ca. 5 s gelegt und anschließend entwickelt.



**Abbildung 5:** Für die Zytokinmessung aus den konditionierten Medien und den unterschiedlich ausgereiften DC-Kulturen wurden die Proben auf die Zytokinarrays nach Herstellerangaben aufgetragen. Die anschließende Messung erfolgte per Chemolumineszenz-Kamera und Röntgenfilmentwicklung.

### 3.9. Endozytoseassays (Dextran-FITC-uptake durch DCs)

Unreife DCs nehmen Antigene wie z.B. Dextrane über unterschiedliche Mechanismen auf, reife DCs besitzen diese Eigenschaft dagegen nicht mehr. Durch Inkubation der Zellen mit FITC-markierten Dextranmolekülen konnte die Aufnahme der Substanzen mittels FACS gemessen werden.

Es wurden  $5 \times 10^4$  DCs in 50  $\mu$ l Medium für mindestens 30 min in Eppendorfröhrchen auf Eis vorbereitet. Anschließend wurden die DCs mit Dextran-FITC (10  $\mu$ g/ml) bei 37 °C für 30 min (bzw. auf Eis als Negativkontrolle) inkubiert. Als zusätzliche Negativkontrolle dienten weiterhin DCs, die nicht mit Dextran-FITC versetzt wurden. Nach 4 Waschvorgängen in 500  $\mu$ l Medium (Tischzentrifuge, 3000/min, 3 min) erfolgte die Fixierung in 37 % Formalin-Lösung und anschließend die FACS Messung.

## 4. Ergebnisse

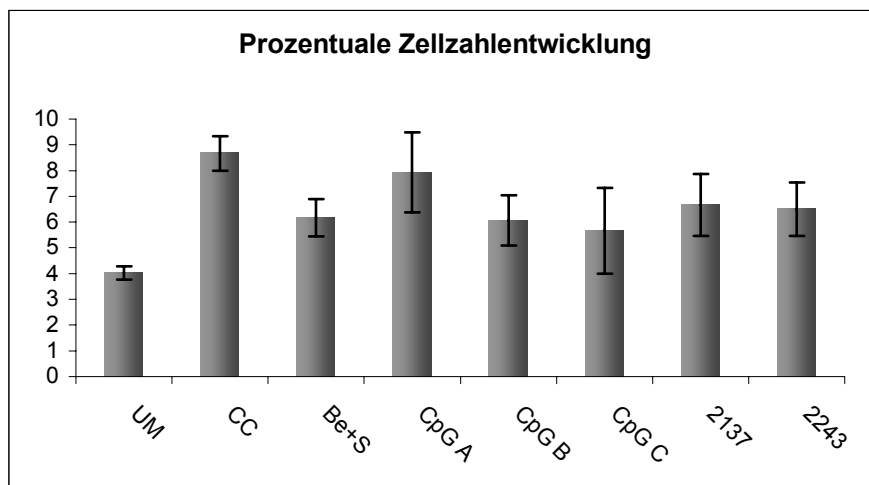
---

### 4.1. Isolierung von PBMCs aus peripherem Blut und Buffy Coats

Von 25 gesunden Blutspendern (8 weibliche, 17 männliche) wurden jeweils ca. 300 - 500 ml Vollblut oder deren Buffy Coats abgenommen. Dabei waren die Blutspender zum Zeitpunkt der Blutabnahme im Alter von 23 - 36 Jahren (im Durchschnitt 26,9 Jahre). Aus einer Blutspende isolierten wir  $3 - 8 \times 10^8$  PBMCs. Die Verwendung der Buffy Coats hatte aufgrund der höheren Zelldichte den praktischen Vorteil, dass beim Pipettieren des Ficoll-Gradienten weniger Material (Ficoll-Lösung/Plastikmaterial) verbraucht wurde und eine Zeitersparnis durch kleinere Pipettierolumina erzielt werden konnte.

### 4.2. Zellzahlentwicklung und Zellmorphologie

Für die *in vitro* Generierung von DCs wurden jeweils  $2 \times 10^7$  PBMCs in 3 - 4 ml Medium zur Adhärenztrennung gebracht. Die Abbildung 6 zeigt, dass davon ungefähr 4 - 10% zu mMoDCs ausreifen, was jeweils von der entsprechenden Kulturbedingung abhängig war. Prozentual entwickelten sich unter CC- und CpG-A-CM-Bedingungen die höchsten Zellzahlen. Die geringste Anzahl an mMoDCs entstand unter UM.



**Abbildung 6:** Prozentuale DC-Zellzahlentwicklung in Relation zur eingesetzten Gesamt-PBMC-Zellzahl (mit zugehörigem Standardfehler der Mittelwerte)

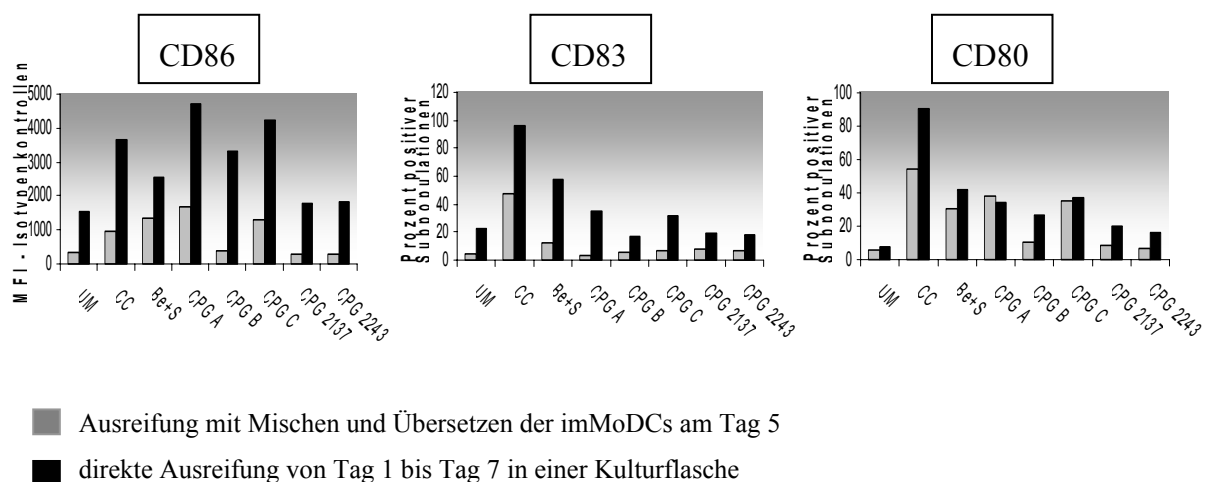


#### 4.3. Herstellung von konditionierten Medien

Für die Ausreifung der imMoDCs wurden verschiedene konditionierte Medien aus PBMC-Kurzkulturen produziert. Die Kombination von konditionierten Medien aus bakteriellen/viralen Extrakten (Begrivac® und Symbioflor® = BeCM+SyCM) fertigten wir zusätzlich für den Vergleich mit CpG-CM aufgrund von phänotypisch und funktionell interessanten Eigenschaften an. Es wurden konditionierte Medien aus 24 h- und 48 h-Kurzkulturen hergestellt und verglichen. Die konditionierten Medien aus den 48 h-Kurzkulturen zeigten stärkere Signale für DC charakteristische Oberflächenmarker, insbesondere der kostimulierenden Moleküle (bisher unveröffentlichte Ergebnisse aus dem Vorprojekt von Benjamin Günther).

#### 4.4. Kultur von mMoDCs

ImMoDCs konnten aus Monozytenkulturen durch Zugabe von GM-CSF und IL-4 generiert werden. Durch Zugabe der Ausreifungsstimuli am Tag 5 differenzierten sich die imMoDCs zu mMoDCs. Die direkte Ausreifung in der Kulturflasche von Tag 1 bis Tag 7 erwies sich dabei bezüglich der Ausreifung der DCs (Expression von kostimulierenden Oberflächenmarkern, Antigen präsentierenden Molekülen und Zellzahlentwicklung) als vorteilhaft. Dagegen beeinflussten verschiedene mechanische Manipulationen am Tag 5 der DC-Kultur (Zellernten, Mischen, Zentrifugieren, Zählen und Aufteilen der imMoDCs in einer 24-Well-Platte) diese o.g. DC-Merkmale negativ (siehe Abbildung 7): Es zeigten sich eine geringere mMoDC-Zellzahlausbeute sowie eine geringere Expression von Antigen präsentierenden und kostimulierenden Oberflächenmarkern. Wir entschieden uns daher für die direkte DC-Ausreifung in einer Kulturflasche bis zum Tag 7 der DC-Kultur, um unnötige mechanische Irritationen während der DC - Kultur zu vermeiden.

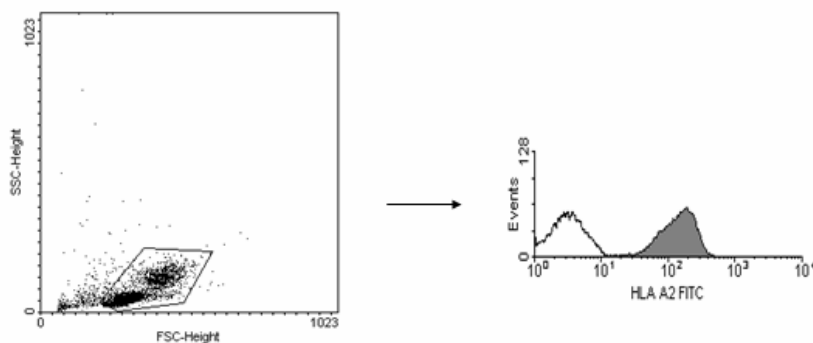


**Abbildung 7:** Einfluss der Ausreifung ohne mechanische Manipulation vs. Ausreifung nach mechanischer Manipulation der imMoDCs am Tag 5. Bei CD80 und CD83 sind mittlere Prozentzahlen von positiven Subpopulationen dargestellt, bei CD86 ist die mittlere Expressionsdichte aus Histogrammen angegeben. Dargestellt sind zwei repräsentative Versuche.

## 4.5. Phänotypisierung

### 4.5.1. *Identifizierung von HLA-A2 positiven Spendern*

Für eine spezifische Immunreaktion war es erforderlich, HLA-A2 positive Blutspender zu identifizieren. Daher wurden die PBMCs unserer Blutspender mit HLA-A2 FITC angefärbt. Von 25 weiblichen und männlichen gesunden Spendern waren 14 Spender HLA-A2 positiv (56%).

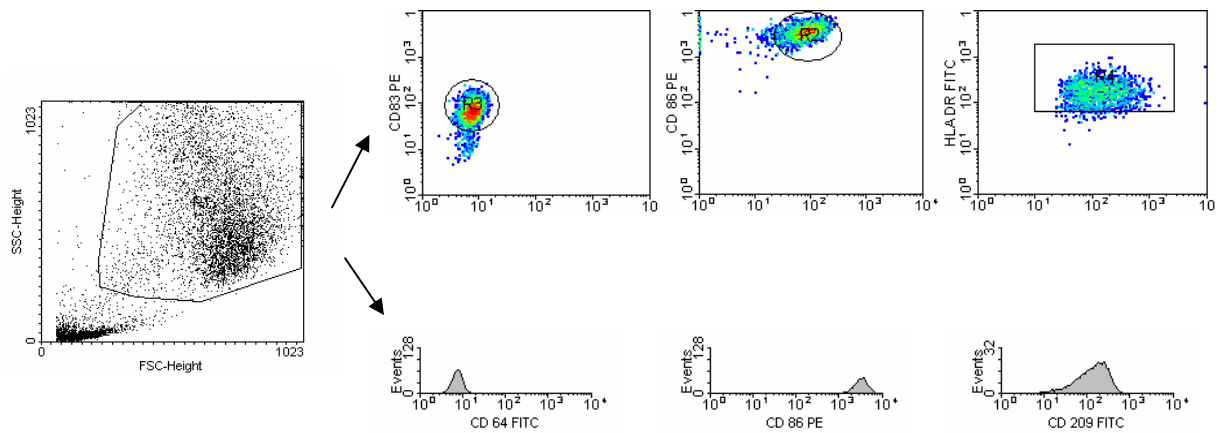


**Abbildung 8:** Identifizierung HLA-A2 positiver Spender mittels Durchflusszytometrie durch Anfärbung mit HLA-A2 FITC-Antikörper und der zugehörigen Isotypenkontrolle.

### 4.5.2. *Durchflusszytometrische Phänotypisierung von DCs*

Die verschiedenen DC-Kulturen wurden mit HLA-DR, CD14, CD16, CD32, CD40, CD64, CD80, CD83, CD86, CD123, CD206, CD209 und den Isotypenkontrollen angefärbt. Die DCs waren durch ihre charakteristische Größe und Granulierung im Forward-/Side-Scatter-Diagramm der Durchflusszytometrie erkennbar. Diese DCs wurden bei der Analyse abgegrenzt und phänotypisch beurteilt.

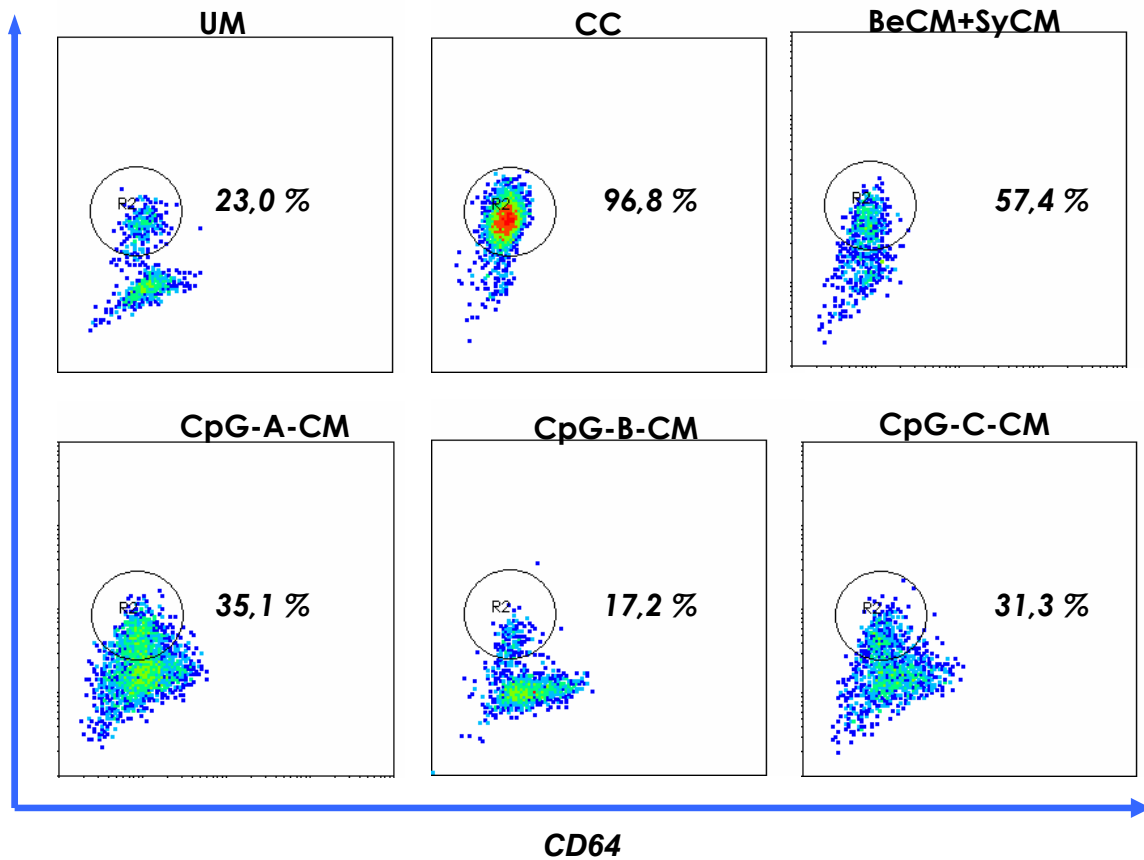
Es wurden insgesamt 11 Versuche für die Phänotypisierung durchgeführt.



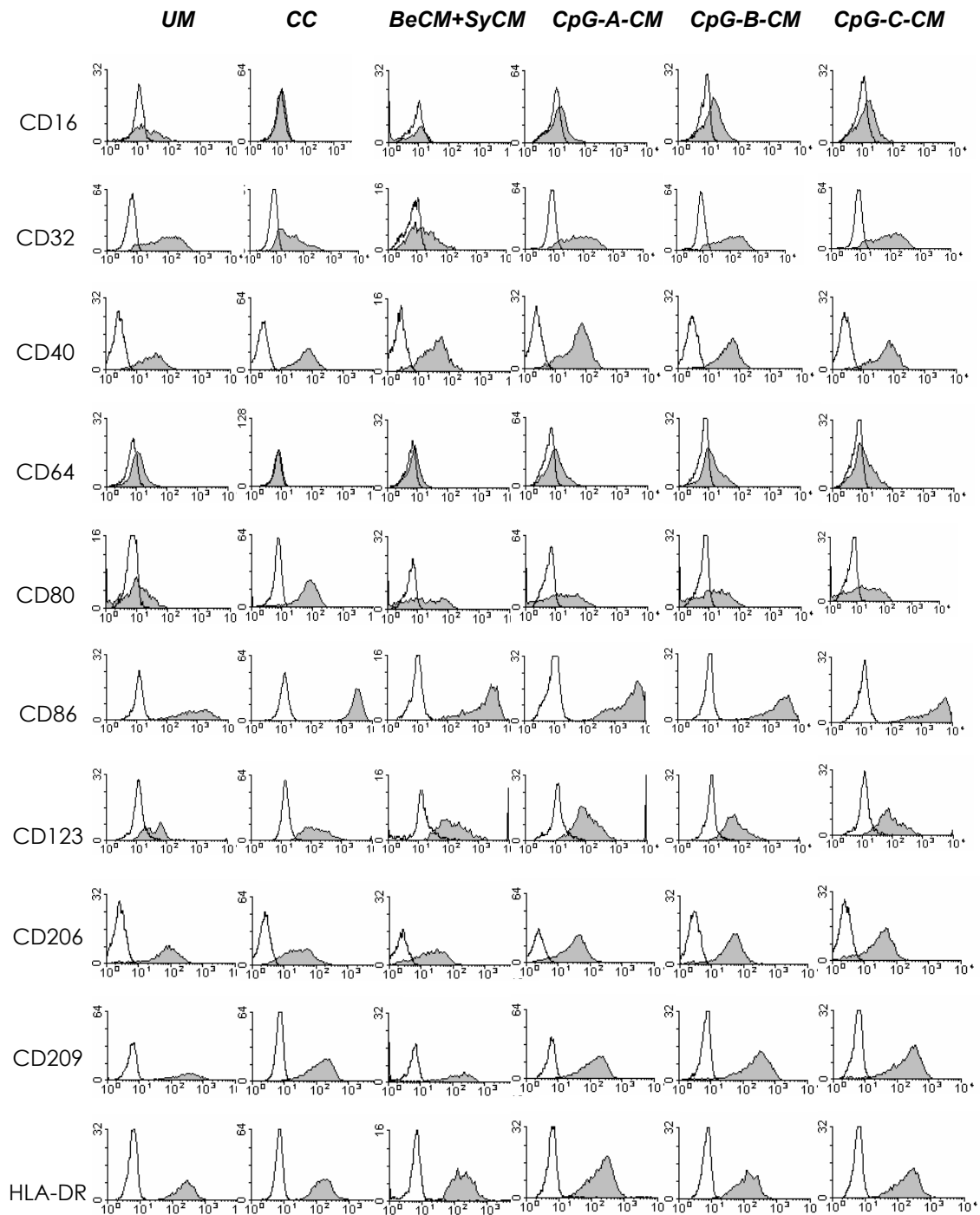
**Abbildung 9:** Nach Abgrenzen der mMoDCs im Forward-/Side-Scatter-Diagramm wurden die DCs anhand ihrer Oberflächenexpression beurteilt. Bei CD83, CD80 und CD123 wurden positive Subkulturen eingegrenzt und prozentual in Bezug auf alle DCs berechnet. Bei allen anderen Markern wurden die Mittelwerte aus Histogrammen ermittelt.

Die Generierung von DCs mittels verschiedener konditionierter Medien und Ausreifungsstimuli (Zugabe von CpG-CM, UM, BeCM+SyCM sowie des CCs) führte zur Ausbildung von verschiedenartigen phänotypischen Profilen der DCs: Der Oberflächenmarker CD83 (typischer „Reifemarker“) wurde auf reifen CC-DCs, hingegen nicht auf unreifen UM-DCs exprimiert. Für die Analyse wurden CD83 positive Subpopulationen eingegrenzt und prozentual ausgewertet. In der Abbildung 10 ist erkennbar, dass unter den verschiedenen Kulturbedingungen der Marker CD83 unterschiedlich stark exprimiert wurde. Diesbezüglich war die Kombination verschiedener Zytokine aus dem CC am stärksten wirksam. Die Kulturbedingung aus der Kombination von bakteriellen Extrakten (BeCM+SyCM) zeigte bei den DCs eine mittelstarke CD83<sup>+</sup>-Subpopulation. Bei den CpG-A-CM- und CpG-C-CM-DCs war noch eine kleine CD83<sup>+</sup>-Subpopulation nachweisbar. Die UM-DCs zeigten den geringsten Anteil an CD83<sup>+</sup>-DCs. Ein repräsentatives Beispiel ist in Abbildung 10 dargestellt.

CD83

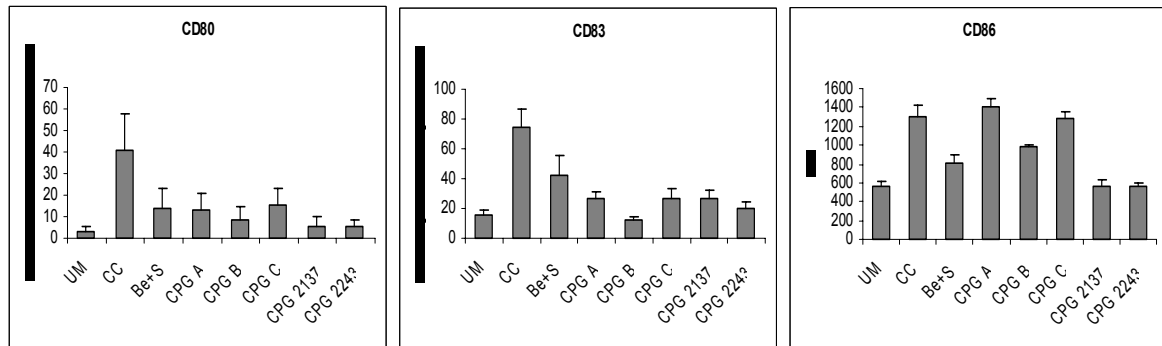


**Abbildung 10:** Phänotypische Modifikation von CD83 und CD64 auf DCs durch verschiedene Reifestimuli. Es wurde die unterschiedliche Entwicklung von CD83<sup>+</sup>-Subpopulationen anhand von Density Plots dargestellt. Auf der x-Achse wurde der Marker CD64 dargestellt, welcher sich relativ gegensätzlich zu CD83 entwickelte: Bei relativ hohen CD83<sup>+</sup>-Expressionen zeigten sich niedrige CD64<sup>+</sup>-Expressionen. Dargestellt ist ein repräsentativer Density Plot aus 7 verschiedenen Messungen.



**Abbildung 11:** Expression von Oberflächenmarkern auf den unterschiedlich ausgereiften mMoDCs. Die grauen Histogramme stellen die Expression der entsprechenden Marker dar, die weißen Diagramme sind die zugehörigen Isotypenkontrollen. Dargestellt ist eine repräsentative Phänotypisierung aus 7 Versuchen.

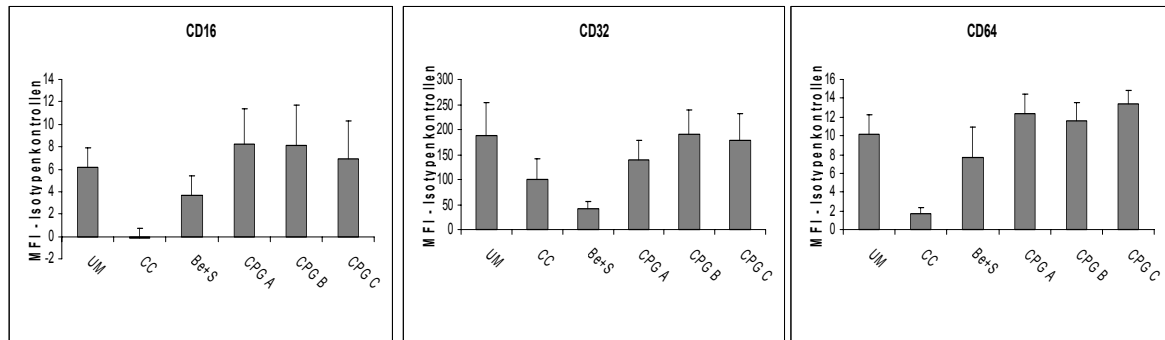
Das kostimulierende Molekül CD80 und der Reifemarker CD83 (siehe Abbildung 12) wurden insbesondere von den CC-DCs, in etwas geringerem Maße von den BeCM+SyCM-DCs, CpG-A-CM- und CpG-C-CM-DCs, hochreguliert und grenzten sich als positive Subpopulationen von den übrigen DCs ab. Die Expression des kostimulierenden Moleküles CD86 war bei den CpG-A-CM-DCs gegenüber den anderen Ausreifungsstimuli durchschnittlich am höchsten ausgeprägt.



**Abbildung 12:** Abgebildet sind die kostimulierenden Moleküle CD80 und CD86 sowie der Reifemarker CD83. Es wurden Mittelwerte abzüglich der Isotypenkontrollen aus 7 unabhängigen Versuchen mit den zugehörigen Standardfehlern der Mittelwerte dargestellt. Bei CD80 und CD83 beziehen sich die Angaben auf eingegrenzte Subpopulationen (Mittelwerte aus Prozentwerten), bei CD86 beziehen sich die Angaben auf mittlere Fluoreszenzwerte aus Histogrammen.

- UM – unstimuliertes Medium
- CC – Zytokin Cocktail (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PG-E<sub>2</sub>, IL-6)
- Be+S – BeCM+SyCM
- CPG A – CpG-A-CM
- CPG B – CpG-B-CM
- CPG C – CpG-C-CM
- CPG 2137 – Kontrolle zu CpG-B-CM
- CPG 2243 – Kontrolle zu CpG-A-CM

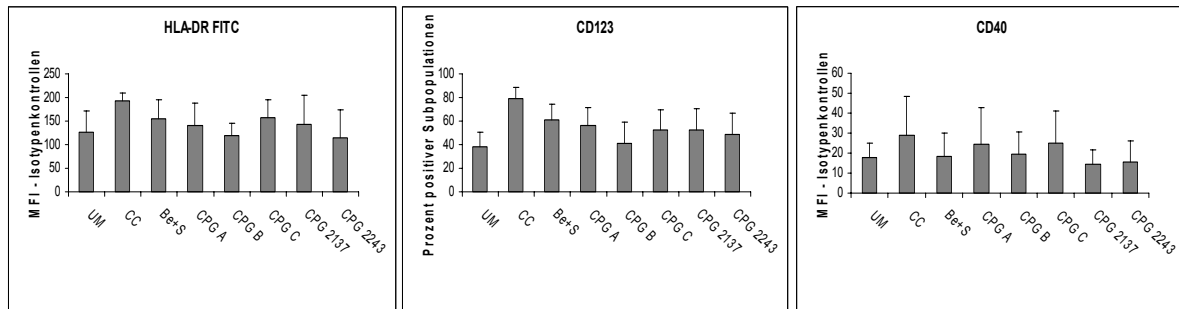
Die Oberflächenmarker CD16 und CD64 (siehe Abbildung 13), welche eine wichtige Rolle für die Endozytose spielen, wurden von den reifen CC-DCs gering, bei den BeCM+SyCM-DCs höher und am stärksten bei den CpG-CM- sowie den UM-DCs exprimiert. Der Marker CD32, dem ebenfalls eine wichtige Rolle hinsichtlich der Endozytoseaktivität zugeschrieben wird, war dagegen bei den BeCM+SyCM DCs am geringsten exprimiert.



**Abbildung 13:** Expression von Phagozytose beteiligten Oberflächenmarkern (CD16, CD32, CD64) auf DCs. Es wurden jeweils Mittelwerte aus Fluoreszenzintensitäten von 7 unabhängigen Versuchen mit den zugehörigen Standardfehlern der Mittelwerte dargestellt.

- UM – unstimuliertes Medium
- CC – Zytokin Cocktail (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PG-E<sub>2</sub>, IL-6)
- Be+S – BeCM+SyCM
- CPG A – CpG-A-CM
- CPG B – CpG-B-CM
- CPG C – CpG-C-CM

Der Antigen präsentierende Komplex HLA-DR (siehe Abbildung 14) wurde unter allen Kulturbedingungen stark exprimiert, am stärksten jedoch von den CC-DCs. Bei CD123 (siehe Abbildung 14) ließ sich erkennen, dass lediglich die CC-DCs eine stärkere Expression aufwiesen. Dabei zeigten die CpG-B-CM- und die UM-DCs die schwächste Expression von CD123, bei allen anderen DCs war diese vergleichbar stark ausgeprägt. CD40 (siehe Abbildung 14) wurde von den CC-, CpG-A-CM- und CpG-C-CM-stimulierten DCs stärker exprimiert als von DCs mit den anderen Reifestimuli.

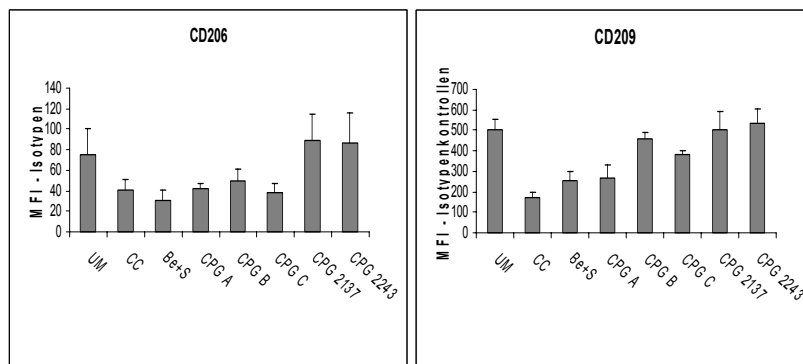


**Abbildung 14:** Expression der Oberflächenmarker HLA-DR, CD123 und CD40 als mittlere Fluoreszenzintensitäten abzüglich der Isotypenkontrollen aus 7 unabhängigen Experimenten mit den zugehörigen Standardfehlern der Mittelwerte.

- UM – unstimuliertes Medium
- CC – Zytokin Cocktail (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PG-E<sub>2</sub>, IL-6)
- Be+S – BeCM+SyCM
- CPG A – CpG-A-CM
- CPG B – CpG-B-CM
- CPG C – CpG-C-CM
- CPG 2137 – Kontrolle zu CpG-B-CM
- CPG 2243 – Kontrolle zu CpG-A-CM

Der Monozyten spezifische Marker CD14 wurde bei keiner der verschiedenen Kulturbedingungen beobachtet (mittlere Fluoreszenzintensität unter 10<sup>1</sup>).

CD206 und CD209 (Abbildung 15) wurden tendenziell auf den UM-DCs und den DCs aus den Kulturen mit CpG-CM-Kontrollen stärker exprimiert als auf den CC- oder BeCM+SyCM-DCs.



**Abbildung 15:** Expression von Oberflächenmarkern CD206 und CD209 auf mMoDCs als mittlere Fluoreszenzintensitäten abzüglich der Isotypenkontrollen aus 4 unabhängigen Experimenten mit zugehörigen Standardfehlern der Mittelwerte.

- UM – unstimuliertes Medium
- CC – Zytokin Cocktail (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PG-E<sub>2</sub>, IL-6)
- Be+S – BeCM+SyCM
- CPG A – CpG-A-CM
- CPG B – CpG-B-CM
- CPG C – CpG-C-CM
- CPG 2137 – Kontrolle zu CpG-B-CM
- CPG 2243 – Kontrolle zu CpG-A-CM



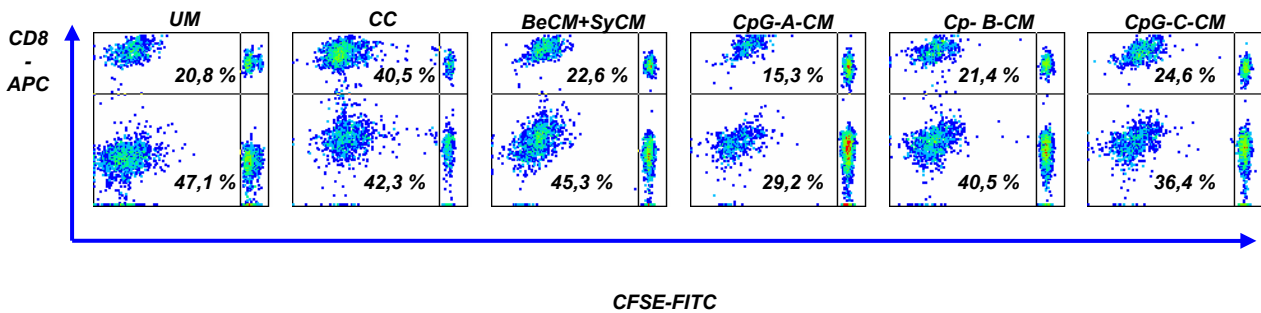
Zusammenfassend lässt sich die folgende semiquantitative Auswertung anhand von FACS-Darstellungen herausarbeiten.

**Tabelle 8:** Zusammenfassung der DC-Phänotypisierung unter verschiedenen Kulturbedingungen. Anhand von Mittelwerten und Subpopulationen aus Histogrammen sowie Dichte-Diagrammen wurde die Oberflächenexpression von Zellmarkern beurteilt: - unter 10e1 Fluoreszenz/keine Expression, + geringe Expression/kleine Subpopulation, ++ mittlere Expression/mittlere Subpopulation, +++ starke Expression/stark positive Subpopulation

Sample	HLA-DR	CD14	CD16	CD40	CD64	CD80	CD83	CD86	CD123	CD206	CD209
<b>UM</b>	+	-	+	-	+	-	-	+	+	++	+++
<b>CC</b>	++	-	-	+	-	++	+++	+++	+++	+	+
<b>CPG-A-CM</b>	++	-	+	+	+	+	+	+++	+++	+	++
<b>CPG-B-CM</b>	++	-	+	-	+	-	-	++	++	++	+++
<b>CPG-C-CM</b>	++	-	+	+	+	+	+	+++	+++	+	++
<b>BeCM+SyCM</b>	++	-	-	-	+	+	++	+++	+++	+	++

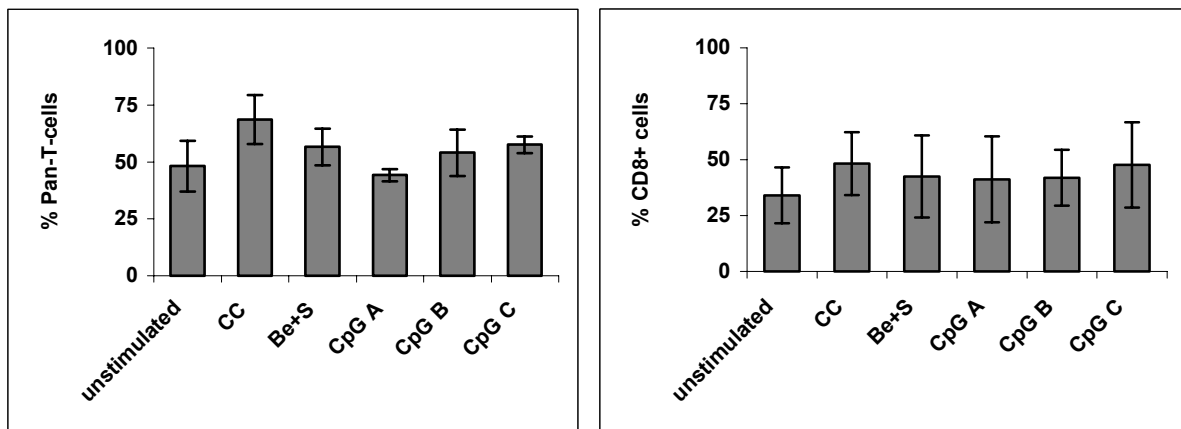
#### 4.6. CFSE-Proliferationsassays

Die Induktion von T-Zell-Proliferationen innerhalb einer gemischten Lymphozytenkultur konnte anhand der CFSE-Aufnahme und der pro-Zellteilung verringerten CFSE-Menge bestimmt werden. Es wurden insgesamt 7 Versuche durchgeführt.



**Abbildung 16:** Entwicklung von T-Zellproliferationen in einer Kokultur von Lymphozyten und DCs. Auf der x-Achse wurde die CFSE-FITC-Proliferationsrate dargestellt und auf der y-Achse die anteilige CD8<sup>+</sup>-Proliferation. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel aus 7 unabhängigen Versuchen.

Alle Pan-T-Zellen proliferierten ähnlich stark unter den verschiedenen DC-Bedingungen, wobei die Pan-T-Zellen aus der CC-DC-Kokultur am stärksten proliferierten. Der Anteil der CD8<sup>+</sup>-Proliferation betrug durchschnittlich ca. 30 - 50 % und war ebenfalls bei den CC-DCs erhöht.

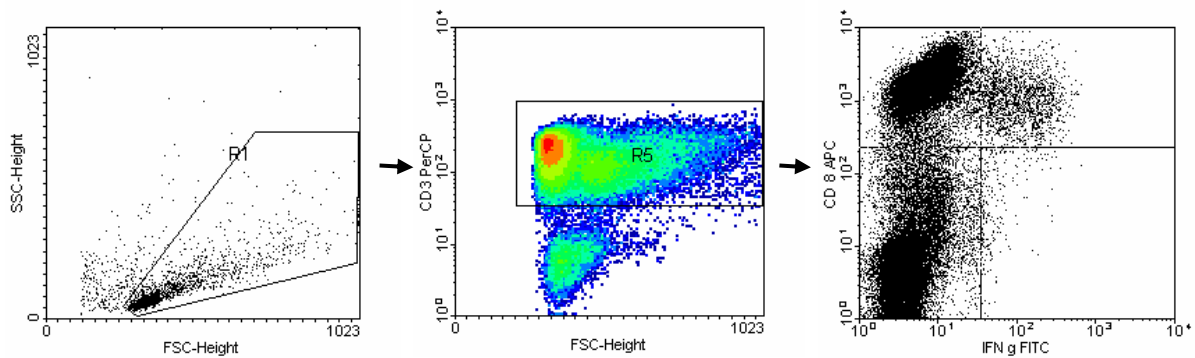


**Abbildung 17:** Induktion von T-Zell-Proliferationen innerhalb von gemischten Lymphozytenkulturen. Dargestellt sind die Mittelwerte der proliferierten Lymphozyten (Pan-T-cells) bzw. der prozentuale Anteil an CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten aus 7 unabhängigen Versuchen mit zugehörigen Standardfehlern der Mittelwerte.

#### 4.7. Spezifische Kokultur von NACs mit Antigen beladenen DCs

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung wurden anhand von intrazellulärer IFN- $\gamma$ -Messung Antigen spezifische T-Zell-Antworten untersucht. Wir führten dazu insgesamt 6 Experimente durch. Für die Kultur inkubierten wir die DCs der unterschiedlichen Kulturbedingungen mit Peptiden (Influenza-Peptid FLU für eine Memory-Antwort und das Peptid K-ras-12V für eine naive T-Zell-Antwort). Anschließend

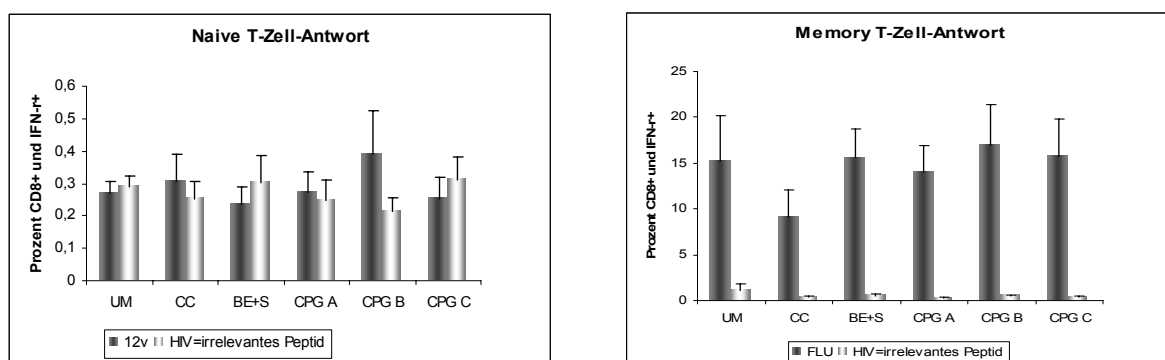
wurden Peptid beladene DCs mit NACs desselben Spenders kokultiviert.



**Abbildung 18:** Im Forward-/Side-Scatter wurden die Lymphozyten eingegrenzt und anschließend die CD3 Expression dargestellt. Die CD3<sup>+</sup>-T-Zellen wurden auf ihre Expression von IFN- $\gamma$  produzierenden CD8<sup>+</sup>-Zellen untersucht. Dargestellt sind FACS-Diagramme (Dot Plots, Density Plots), die die Eingrenzung der Lymphozyten  $\rightarrow$  Anteil der CD3<sup>+</sup>-Zellen  $\rightarrow$  Anteil der IFN- $\gamma$  produzierenden CD8<sup>+</sup>-Zellen zeigen (im rechten Diagramm rechts oben).

Eine T-Zell-Antwort wurde als positiv bewertet, wenn in der stimulierten Probe mindestens doppelt so viele IFN- $\gamma$  sezernierende Zellen wie in der Negativkontrolle gezählt wurden. Die Memory-Antwort auf das Influenza Peptid FLU fiel bei allen Kulturbedingungen etwa gleich stark aus, wobei eine leicht stärkere IFN- $\gamma$ -Ausschüttung bei den BeCM+SyCM- und CpG-B-CM-DCs zu erkennen war. Die Kulturen mit CC-DCs zeigten allerdings schwächere spezifische FLU-Memory-CD8<sup>+</sup>-Antworten als die Zellen aus den CpG-CM- oder UM-DC-Kulturen.

Bei 2 von 6 Versuchen konnten K-ras-12V-Peptid spezifische, IFN- $\gamma$  produzierende CD8<sup>+</sup>-Zellen in den CpG-B-CM gereiften DC-Kulturen nachgewiesen werden. Es kann nicht sicher ausgeschlossen werden, ob es sich hier möglicherweise um Artefakte handelte.



**Abbildung 19:** Prozentualer Anteil von IFN- $\gamma$  produzierenden CD8<sup>+</sup>-Zellen an CD3<sup>+</sup>-Lymphozyten. Linke Abbildung: Naive T-Zell-Antwort auf K-ras-12V, rechte Abbildung Memory-T-Zell Antwort auf FLU. Dargestellt sind prozentuale Anteile von IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen an CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten mit den zugehörigen Standardfehlern der Mittelwerte aus 6 unabhängigen Experimenten. UM=unstimuliertes Medium, CC=Zytokin-Cocktail, Be+S=BeCM+SyCM, CpG-A=CpG-A-CM, CpG-B=CpG-B-CM, CpG-C=CpG-C-CM.

#### 4.8. Zytokinprofile

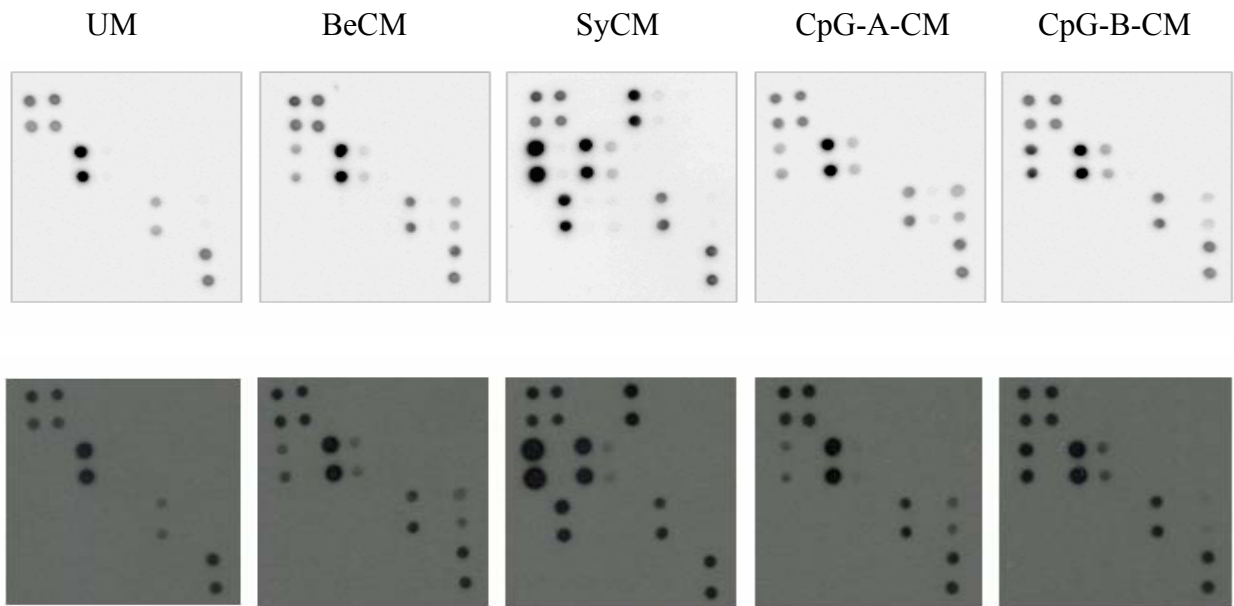
Ziel der Zytokinanalysen war es, zu erklären, unter welchem Zytokin-Einfluss die unterschiedlichen DCs bestimmte funktionelle und phänotypische Eigenschaften entwickelten. Wir gingen der Frage nach, welche Zytokine durch Zugabe der bestimmten Stimuli stärker ausgeschüttet bzw. supprimiert wurden. Hierfür wurden 20 Zytokine, die im Zusammenhang mit der DC-Ausreifung stehen (siehe Tabelle 2, Einleitung), mithilfe von speziellen Zytokin-Membranen (RayBio Human Cytokine Antibody Arrays<sup>®</sup>, RayBiotech, Inc.) analysiert.

##### *4.8.1. Zytokinanalysen in den konditionierten Medien*

Die konditionierten Medien UM, BeCM, SyCM, CpG-A-CM und CpG-B-CM wurden aufgrund des unter ihrem Einfluss entstehenden DC-Phänotyps für die Zytokin-Profilierung ausgewählt.

Die Zytokinanalysen erfolgten nach Angaben des Herstellers. Positive Signale detektierten wir mittels Chemolumineszenz-Kamera und Röntgenaufnahmen. Die Chemolumineszenzen wurden anschließend anhand ihrer Intensitäten quantitativ ausgewertet.

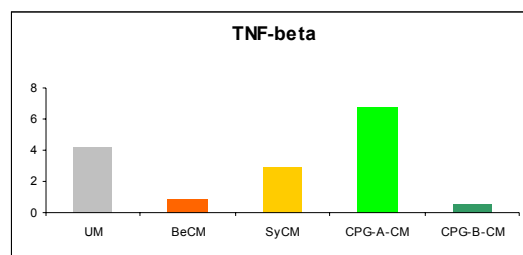
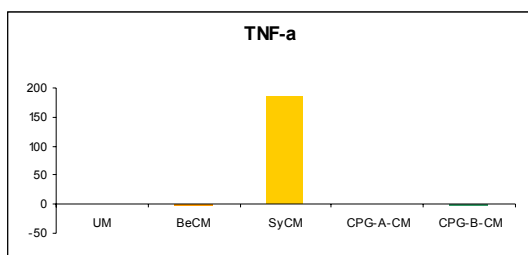
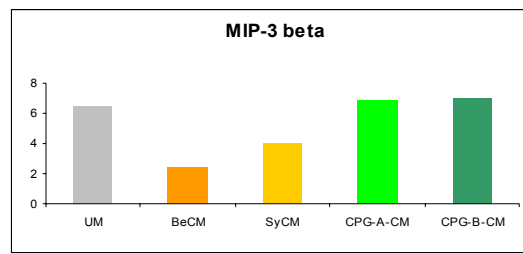
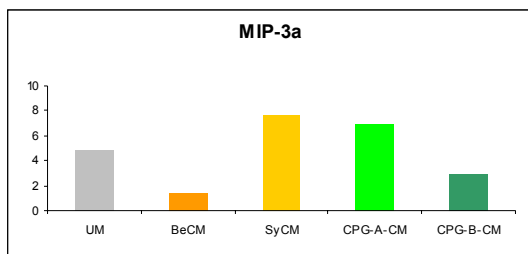
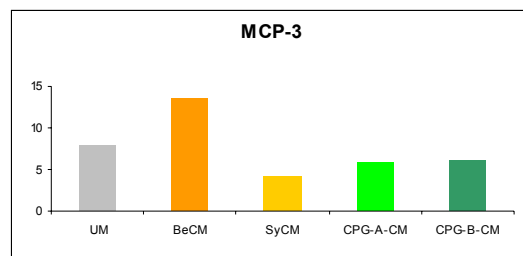
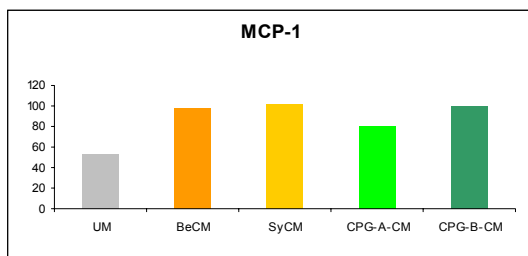
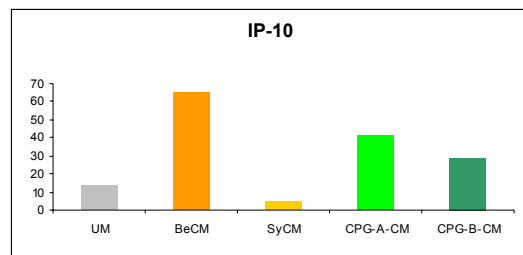
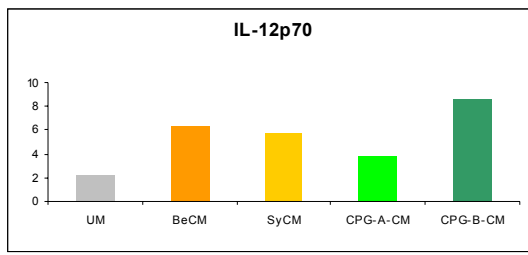
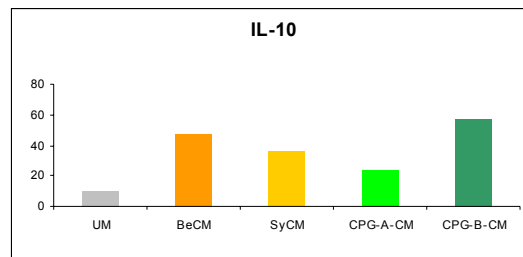
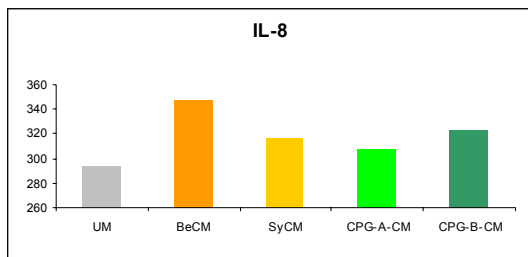
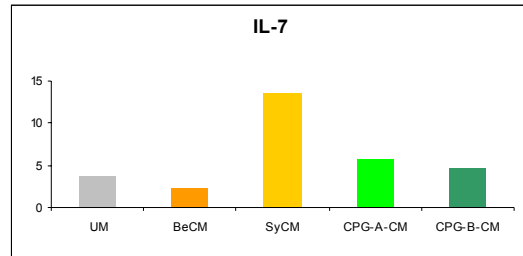
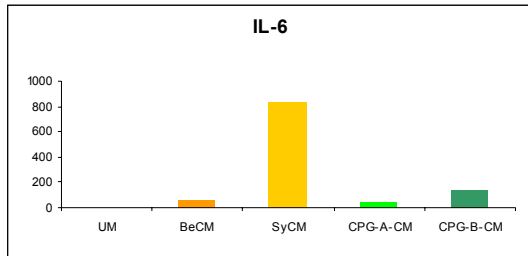
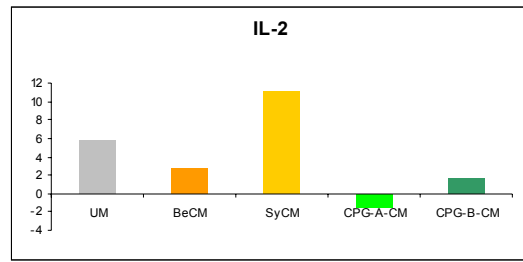
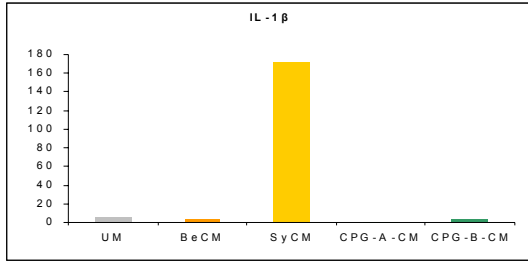
Aufgrund der geringeren Signalsensitivität waren die Röntgenaufnahmen besser geeignet für die Aufzeichnung von starken Signalen, die schwachen Signale hingegen stellten sich besser in den Chemolumineszenzaufnahmen dar.



**Abbildung 20:** Zytokinmembranen (RayBio Human Cytokine Antibody Array<sup>®</sup>) mit verschiedenen positiven Signalen der konditionierten Medien mittels Chemolumineszenz-Kamera: Detektionszeit 60 s (oben) und Röntgenfilmaufnahme: Detektionszeit 5 s (untere Abbildung).

In Abbildung 20 sind die unterschiedlichen Zytokinprofile der verschiedenen konditionierten Medien erkennbar. Für die quantitative Auswertung wurden die jeweiligen Signale in Relation mit der Positivkontrolle (auf den Zytokinmembranen rechts unten) gesetzt (Abbildung 21).

Prozent



**Abbildung 21:** Vergleich der verschiedenen Zytokinprofile in den konditionierten Medien. PBMCs von 3 gesunden Spendern wurden für die Herstellung von konditionierten Medien eingesetzt. Anschließend wurden diese konditionierten Medien aus PBMC-Kurzulturen abgenommen, gemischt und auf die Zytokinmembranen aufgetragen. Die Abbildung zeigt relative Signalintensitäten (in Bezug auf die Positivkontrolle).

■ UM    ■ BeCM    ■ SyCM    ■ CpG-A-CM    ■ CpG-B-CM

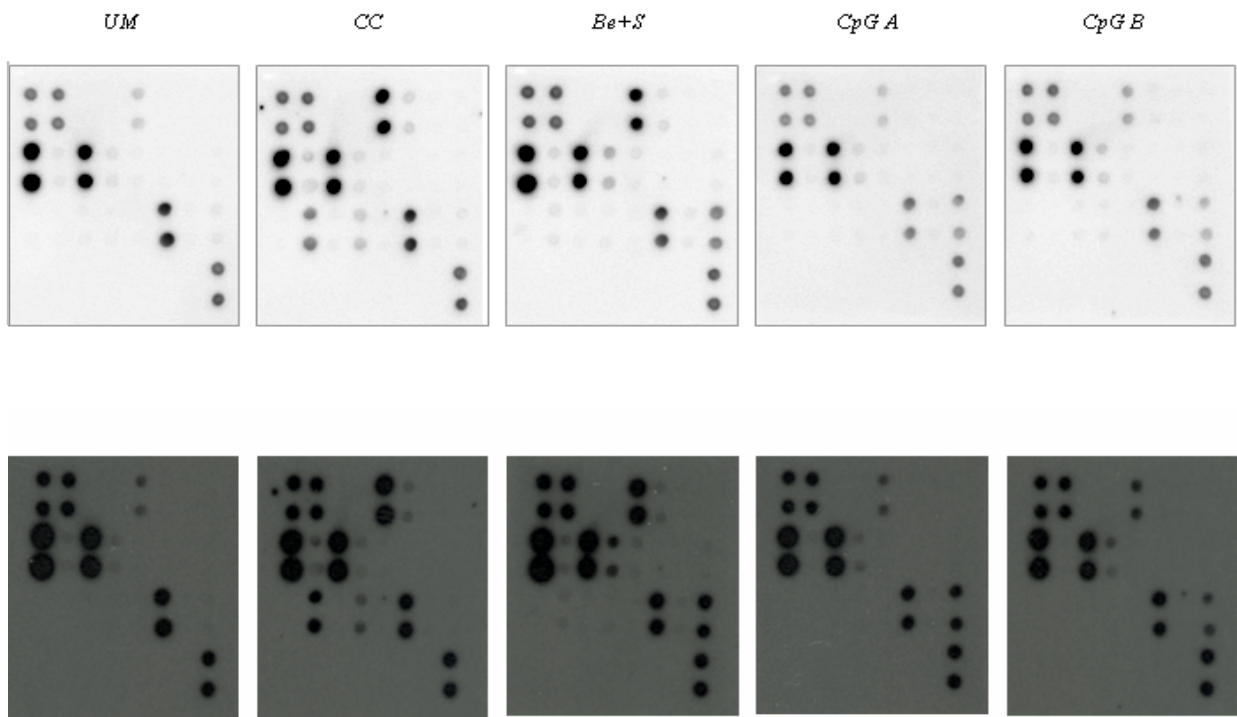
In der Tabelle 5 werden die wesentlichen Zytokinprofile der konditionierten Medien erläutert.

**Tabelle 9:** Beschreibung der unterschiedlichen Zytokinprofile in den konditionierten Medien

UM	Verglichen mit allen anderen Kulturbedingungen befanden sich im UM wie erwartet anteilmäßig die geringsten Zytokinmengen. Das im UM am stärksten nachweisbare Zytokin war IL-15 und betrug in der Intensität lediglich 7 % (im Verhältnis zur Positivkontrolle, welche mit 100 % gleichgesetzt wurde). In anderen konditionierten Medien war IL-15 nicht nachweisbar. IL-6, IL-8 und IL-10 wurden bei UM am geringsten ausgeschüttet.
SyCM	Bei SyCM waren viele Zytokine erhöht nachweisbar. IL-1 $\beta$ hatte eine Signalintensität von über 170 %, in den anderen Überständen lag IL-1 $\beta$ nur bei 10 %. TNF- $\alpha$ lag bei SyCM bei 186 %, in allen anderen konditionierten Medien war TNF- $\alpha$ kaum nachweisbar. MCP-1 war ebenfalls bei SyCM am stärksten vorhanden, wurde jedoch in allen anderen Überständen (abgesehen von UM) ähnlich stark detektiert (bei ca. 100 %). IL-7 wurde ebenfalls durch SyCM am stärksten ausgeschüttet (IL-7 lag bei 14 %, dagegen in den anderen Überständen unter 6 %). Das am stärksten nachweisbare Zytokin war IL-6 in den gesamten Zytokinanalysen, welches bei 840 % Signalintensität im SyCM lag, gefolgt vom CpG-B-CM, wo IL-6 bei 135 % lag. In allen anderen konditionierten Medien befand sich IL-6 bei unter 60 %. IL-2 zeigte auch im SyCM mit 11 % die stärkste relative Signalstärke (in anderen Überständen 0 – 6 %). Im SyCM befanden sich die geringsten Intensitäten an IP-10 (bei 5 %, in anderen konditionierten Medien bis zu 65 %).
BeCM	Bei BeCM war IP-10 am stärksten nachweisbar (bei 65%). MCP1 (mit 13%), MCP3 (ca.100%) und IL-8 (bei 350%) erreichten ebenfalls die höchsten Signalstärken im Vergleich zu den anderen CM. IL-7 war im BeCM am geringsten nachweisbar.
CpG-A-CM	Im CpG-A-CM war der TNF- $\beta$ -Anteil am höchsten im Vergleich zu den anderen CM (bei 7 %), wobei TNF- $\beta$ insgesamt nur sehr schwache Signalstärken aufwies (in allen anderen Überständen unter 4%). IP-10 und MIP-3 $\alpha$ waren ebenfalls im CpG-A-CM stärker vorhanden als in den anderen Überständen (IP-10 bei 40 % und MIP-3 $\alpha$ bei 7 %).
CpG-B-CM	Im CpG-B-CM befanden sich die höchsten IL-12p70- und IL-10-Anteile im Vergleich zu den anderen Überständen (IL-12p70 bei 9 % und IL-10 bei 58 %). IL-8 zeigte ebenfalls im CpG-B-CM eine hohe Signalintensität (bei 320 %). Im CpG-B-CM lag MCP-1 genau wie im BeCM und SyCM im oberen Bereich bei ca. 100 %.

#### 4.8.2. Zytokinanalysen in den Kulturüberständen der mMoDCs

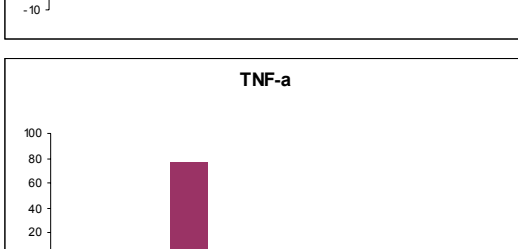
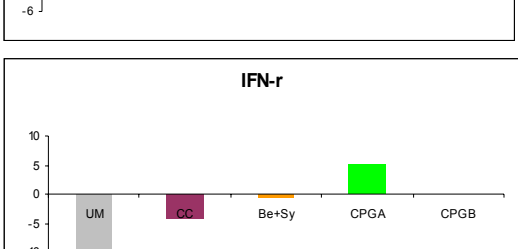
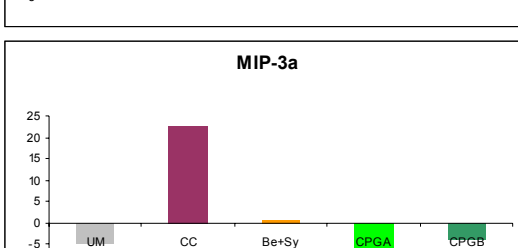
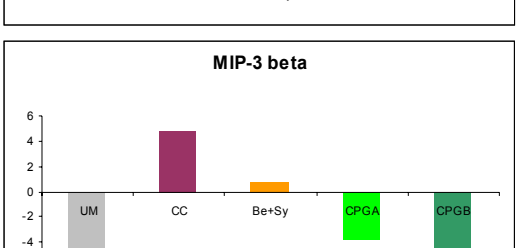
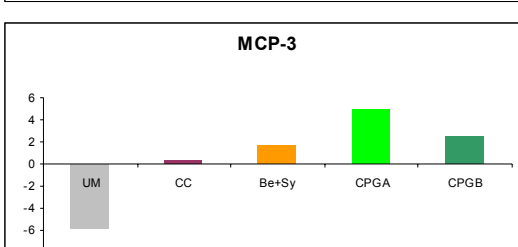
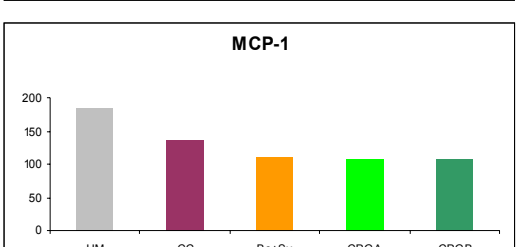
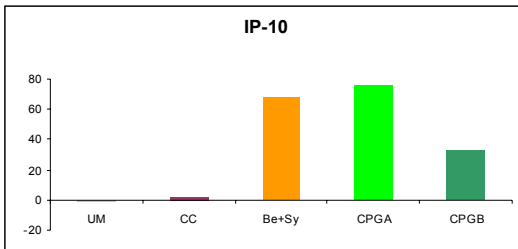
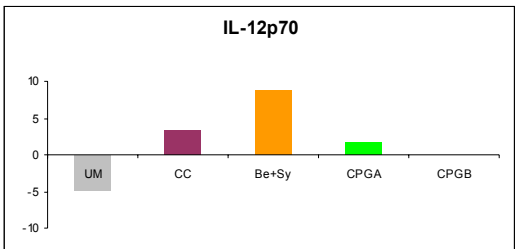
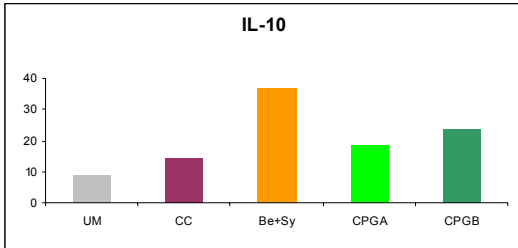
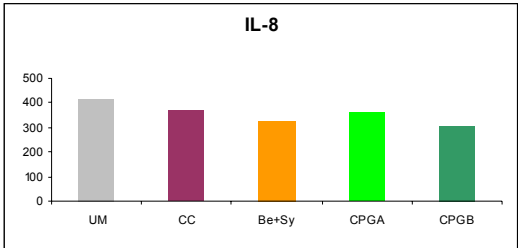
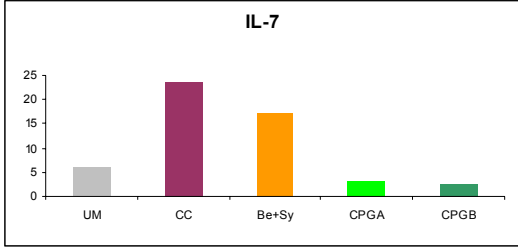
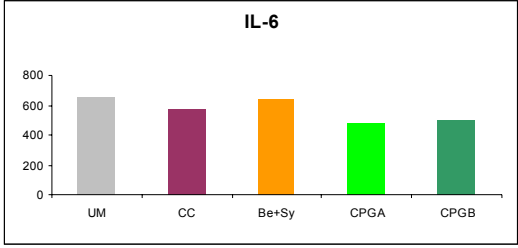
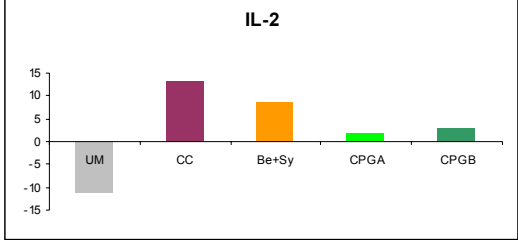
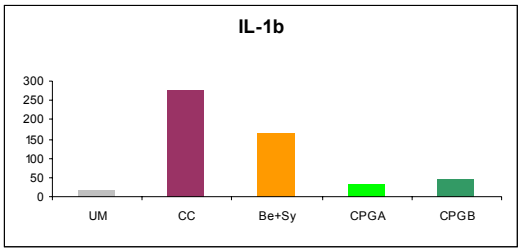
Aus den mMoDC-Kulturen wurden erneut Kulturüberstände abgenommen, um die jeweiligen Zytokinprofile zu analysieren.



**Abbildung 22:** Zytokinmembranen (RayBio Human Cytokine Antibody Arrays<sup>®</sup>) mit verschiedenen positiven Signalen der mMoDC-Kulturüberstände mit den Bedingungen: UM, CC, BeCM+SyCM, CpG-A-CM und CpG-B-CM mittels Chemolumineszenz-Kamera: Detektionszeit 60 s (obere Abbildung) und Röntgenfilmaufnahme: Detektionszeit 5 s (untere Abbildung)



Prozent



**Abbildung 23:** Zytokinprofile in den mMoDC-Kulturen. DCs wurden nach Stimulation mit konditionierten Medien (bakterielle Extrakte, CpG-Oligonukleotide) und dem CC (TNF- $\alpha$ , PG-E<sub>2</sub>, IL-6, IL-1 $\beta$ ) bis zum Tag 7 ausgereift. Am Tag 7 wurden die Kulturüberstände abgenommen. Es wurden jeweils 3 Proben (d.h. aus 3 Versuchsreihen) aus der jeweiligen Kulturbedingung gemischt.

■ DC Überstand aus UM ■ DC Überstand aus CC ■ DC Überstand aus BeCM+SyCM  
 ■ DC Überstand aus CpG-A-CM ■ DC Überstand aus CpG-B-CM

Die Tabelle 10 zeigt die verschiedenen Zytokinprofile in den DC-Kulturen.

**Tabelle 10:** Beschreibung der Zytokinprofile in den verschiedenen DC-Kulturen

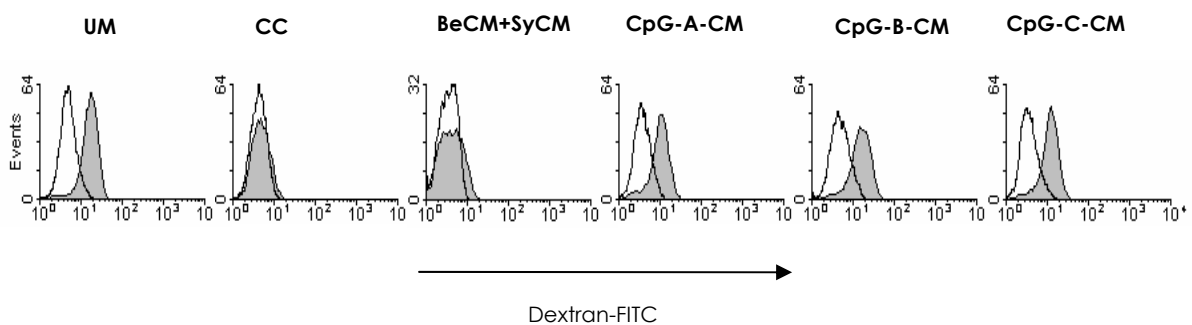
UM	Wie die Abbildung 23 zeigt, waren in der UM-DC-Kultur viele Zytokine (IL-1 $\beta$ bei 18 %, IL-2 bei 0 %, IL-10 bei 9 %, IL-12p70 bei 0 %, MCP-3 bei 0 %) im Vergleich zu den anderen Kulturbedingungen am geringsten nachweisbar. Die meisten Zytokine zeigten im UM die geringsten Anteile oder konnten gar nicht nachgewiesen werden. IL-8 (419 %), MCP1 (183 %), IL-6 (654 %) befanden sich allerdings mit den höchsten Mengen in UM im Vergleich zu den anderen DC-Kulturüberständen.
CC	In den DC-Kulturüberständen des CCs (Kombination aus TNF- $\alpha$ , PG-E <sub>2</sub> , IL-1 $\beta$ , IL-6) waren erwartungsgemäß die zugegebenen Zytokine TNF- $\alpha$ (76 %), IL-1 $\beta$ (268 %) und IL-6 (575 %) in hohen Anteilen vorhanden.
BeCM+SyCM	In der Kulturbedingung BeCM+SyCM zeigten die Zytokine IL-1 $\beta$ (167 %), IL-6 (638 %), IL-7 (17 %) und IP-10 (68 %) ebenfalls eine starke Intensität. Maximale Zytokinmengen lagen im Vergleich zu den anderen mMoDC-Kultur-Überständen bei IL-10 (36 %) und IL-12p70 (9 %) vor.
CpG-A-CM	Die Kulturbedingung CpG-A-CM zeigte die höchsten IP-10-Mengen, alle anderen Zytokine waren unauffällig (entweder sehr geringe Zytokinmengen oder im Bereich wie alle anderen Kulturüberstände).
CpG-B-CM	Im CpG-B-CM befanden sich nur geringe Zytokinmengen bzw. ähnlich hohe Zytokinmengen wie in anderen Kulturbedingungen.

Ein Nachteil der Zytokinanalysen war, dass keine absoluten Zytokinmengen gemessen werden konnten. Es konnte nur ein Bezug auf die Positivkontrolle hergestellt und prozentuale Angaben gemacht werden. Es bleibt weiterhin offen, ob die Zytokine in manchen Überständen weniger sezerniert wurden oder ob sie eventuell verstärkt abgebaut wurden.

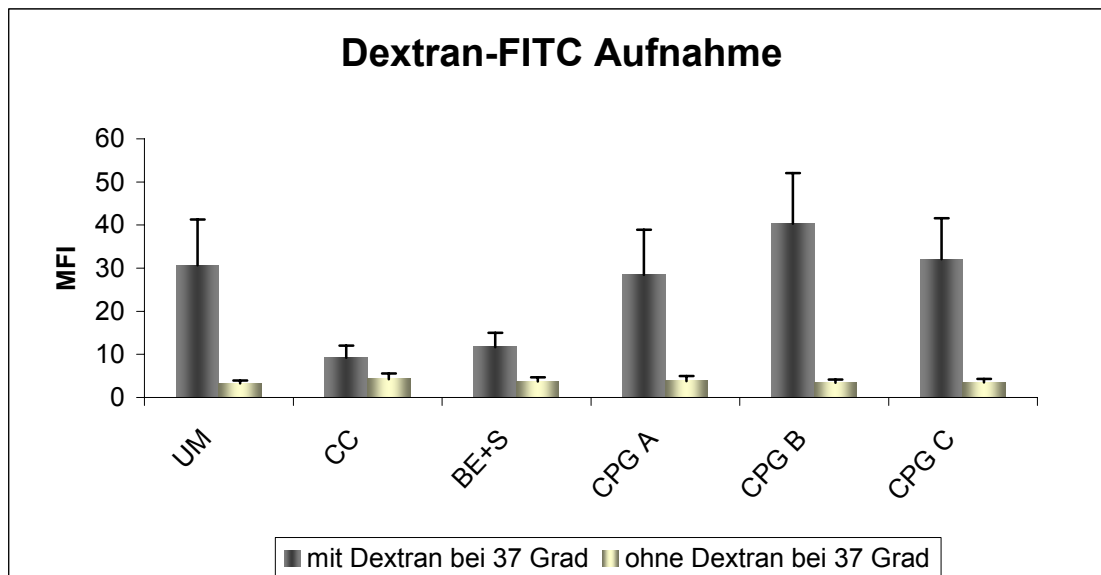
#### 4.9. Endozytoseassays (Dextran-FITC-uptake durch DCs)

Ein Merkmal von unreifen DCs ist, dass sie bestimmte Antigene oder Substrate wie Dextran per

Phagozytose aus ihrer Umgebung aufnehmen können. Es wurden dazu 3 Versuche durchgeführt. In der Immunphänotypisierung wurde bereits dargestellt, dass unter den Kulturbedingungen UM, CpG-A-CM, CpG-B-CM und CpG-C-CM die Oberflächenmarker CD16, CD32 und CD64, die an Endozytose-Mechanismen beteiligt sind, verstärkt exprimiert wurden. Dagegen waren diese Oberflächenmarker bei den CC-DCs weniger stark ausgeprägt. Nach fünftägiger Kultur und anschließender Reifeinduktion wurden die DCs auf ihre Aufnahmefähigkeit von Dextran-FITC untersucht. Wie auf den Abbildungen 24 und 25 zu erkennen ist, war bei den CC-DCs sowie bei den BeCM+SyCM-DCs ein Rückgang der Endozytose-Aktivität zu beobachten. Bei den DCs, die mit CpG-CM ausreifen, konnte man eine ähnlich starke Endozytose-Aktivität wie bei den UM-DCs erkennen.



**Abbildung 24:** Einfluss von verschiedenen Reifestimuli auf die Endozytose-Aktivität von DCs. Die grauen Histogramme stellen die Dextran-FITC-Aufnahmen bei 37 °C dar, die weißen Histogramme sind die Kontrollen bei 4 °C. Es wurde ein repräsentatives Ergebnis aus 3 Versuchen dargestellt.



**Abbildung 25:** Endozytoseaktivität von DCs. Dargestellt sind Mittelwerte (mit den zugehörigen Standardfehlern der Mittelwerte) und Negativkontrollen der Dextran-FITC-Aufnahmen aus 3 unabhängigen Experimenten. Kulturbedingungen:

UM=unstimuliertes Medium, CC=Zytokin-Cocktail, Be+S=BeCM+SyCM, CpG-A=CpG-A-CM, CpG-B=CpG-B-CM, CpG-C=CpG-C-CM

## 5. Diskussion

---

### 5.1. Konditionierte Medien als Alternative zur DC-Aktivierung?

In dieser Dissertation untersuchten wir die phänotypische und funktionelle Modifikation von MoDCs durch konditionierte Medien, die wir aus PBMC-Kurzzeitkulturen mit CpG-Oligonukleotiden bzw. bakteriellen Extrakten produzierten. Viele Arbeiten weisen darauf hin, dass CpG-Oligonukleotide zwar einen direkten Einfluss auf plasmazytoide DCs, nicht jedoch auf MoDCs zeigen (z.B. Rothenfusser et al. 2002). Humane MoDCs exprimieren keine oder zu wenig TLR9, so dass CpG-Oligonukleotide hier nicht direkt wirken können (Krug et al. 2003, Rothenfusser et al. 2004). CpG-Oligonukleotide werden nicht von menschlichen myeloiden DCs und Monozyten erkannt (im Gegensatz zu Mäusen, die höhere TLR9-Expressionen auf myeloiden DCs und Monozyten aufweisen - Wagner et al. 2004). Wir gingen der Frage nach, ob konditionierte Medien aus CpG-Oligonukleotiden oder bakteriellen Extrakten einen Einfluss auf die Ausreifung von MoDCs haben könnte, was bisher noch nicht von den o.g. Arbeitsgruppen untersucht wurde.

Eine potente Immunantwort auf spezifische Antigene ist nur durch die Aktivierung von Antigen präsentierenden DCs durch verschiedene Gefahrensignale möglich (Banchereau et al. 2000). Diese Gefahrensignale können durch das Eindringen von Mikroorganismen, entzündlichen Gewebereaktionen oder durch ungeordneten Zellzerfall erzeugt werden. Die Aktivierung von DCs führt zu veränderten dendritischen Zellfunktionen und Phänotypen. Kostimulierende Oberflächenmoleküle, Antigen präsentierende Moleküle und Reifemarker werden stärker exprimiert, wogegen die Fähigkeit zur Aufnahme von Antigenen (Endozytose) mit zunehmendem Reifungsgrad abnimmt.

Einige Autoren haben beschrieben, dass bestimmte CpG-Oligonukleotide zu einer phänotypischen Veränderung der MoDCs führen: Gursel et al. berichteten 2002 von einer neuen Untergruppe von CpG-A, die MoDCs zur Ausreifung stimulieren sowie eine Down-Regulation vom monozytenspezifischen Marker CD14 zeigen. Die meisten Autoren widerlegten jedoch eine Sensibilität von humanen MoDCs auf CpG-Oligonukleotide aufgrund der unzureichenden Expression von TLR9.

Bisher wurde nicht untersucht, inwieweit CpG-Oligonukleotide oder bakterielle Extrakte als Gefahrensignale gewissermaßen sekundäre Signale (Zytokine und andere immunmodulatorische Faktoren) freisetzen, wenn PBMCs damit stimuliert werden. Solche sekundären Faktoren analysierten wir in dieser Arbeit. Wir haben konditionierte Medien aus PBMC-Kurzzeitkulturen mit CpG-Oligonukleotiden und bakteriellen Extrakten hergestellt und konnten zeigen, dass die so gewonnenen konditionierten Medien eine Stimulierung von humanen MoDCs mit einer erhöhten Expression von

kostimulierenden Molekülen und Antigen präsentierenden Molekülen bewirkten. Zudem gelang es uns, diese sekundären Faktoren, wie z.B. wichtige DC-aktivierende, antitumorale oder proinflammatorische Zytokine, in den entsprechenden konditionierten Medien nachzuweisen.

Durch Herstellung von konditionierten Medien sollten *in vitro* die *in vivo* Verhältnisse teilweise simuliert werden. CpG-Oligonukleotide können PBMCs zur Zytokinproduktion aktivieren. In den aus PBMC-Kurzkulturen gewonnenen konditionierten Medien befanden sich wichtige Zytokine für die Ausreifung von DCs, die das Potenzial zur DC-Aktivierung besaßen, was wir durch unsere phänotypischen und funktionellen Tests beweisen konnten.

## 5.2. Generierung und phänotypische Eigenschaften von DCs

Gegenwärtig existieren mehrere Protokolle für die Generierung von MoDCs aus adhärennten Monozyten, die jedoch in wichtigen Teilaspekten erhebliche Unterschiede aufweisen (Romani et al. 1994, Sallusto und Lanzavecchia 1994, Alijagic et al. 1995, Romani et al. 1996 und Thurnher et al. 1997). Wir haben in dieser Arbeit ein optimiertes Ausreifungsprotokoll für die Kultur von MoDCs durch GM-CSF, IL-4 und die entsprechenden konditionierten Medien bzw. den CC erarbeitet: Durch die kontinuierliche Generierung der DCs in einer Kulturflasche bis zum Kulturende (Tag 7) konnte eine wesentlich stärkere Expression der DC spezifischen Oberflächenmoleküle erreicht werden. Dadurch wurde auch der mechanische Stress (Zentrifugieren, erneutes Zählen und Einstellen der Zellzahlen, Wechseln von Plastikoberflächen, häufigeres Waschen mit erhöhter Kontaminationsgefahr) weitgehend vermieden. Zusätzlich war diese Methode zeitsparender, da lediglich die konditionierten Medien am Tag 5 hinzugegeben werden mussten.

MoDCs haben insbesondere im Hinblick auf den klinischen Gebrauch den Vorteil, dass sie sich leicht aus dem peripheren Blut gewinnen und die DCs in großer Zellzahl innerhalb von 5 - 7 Tagen *in vitro* generieren lassen. Selbst bei Tumorpatienten mit fortgeschrittener Erkrankung konnten MoDCs so generiert werden (Romani et al. 1994). Das Verfahren zur DC-Generierung aus Monozyten, das in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, entspricht im Wesentlichen vorbeschriebenen Kulturprotokollen (Romani et al. 1994, Bender et al. 1996, Thurner et al. 1999). Die Aktivierung von DCs erfolgte einerseits mit den konditionierten Medien (aus CpG-Oligonukleotiden und bakteriellen Extrakten) und andererseits mit dem bekannten CC (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PG-E<sub>2</sub>, IL-6), wie er auch in ähnlicher Zusammensetzung heute noch zur Aktivierung von DCs eingesetzt wird (z.B. Zobywalski et al. 2007). Die Ausbeute an mMoDCs von durchschnittlich 4 – 10 % von den ursprünglich eingesetzten PBMCs entsprach ungefähr der Menge anderer Arbeitsgruppen.

Die Ausreifung von DCs durch konditionierte Medien wurde bisher nicht analysiert, so dass kein direkter Vergleich zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen möglich ist. Wir konnten DCs generieren, die phänotypisch kostimulierende Moleküle und Antigen präsentierende Marker ähnlich stark exprimierten wie DCs, die mit dem bekannten und oft verwendeten CC ausreifen. Die DCs, die durch eine Kombination bakterieller Extrakte ausreifen (BeCM+SyCM), zeigten eine DC-Aktivierung (CD83-Expression) und waren den CC-DCs phänotypisch am ähnlichsten. Die stärksten CD83-Expressionen waren jedoch wie erwartet bei den CC-DCs erkennbar.

DC-Aktivierungen im Sinne von erhöhten CD83-Expressionen zeigten sich auch in geringerer Ausprägung bei den CpG-CM-DCs: Hier entwickelten sich CD83<sup>+</sup>-Subpopulationen. Die Rolle des CD83-Markers ist bisher noch nicht genau erforscht, so dass offen bleibt, ob dieser eine essentielle Rolle für therapeutisch genutzte DCs spielt.

Die für unreifere DC-Stadien charakteristischen Phagozytose-Rezeptoren und damit die Fähigkeit zur Antigenaufnahme blieben bei den DCs, die mittels konditionierter Medien ausreifen, erhalten. Somit könnten diese DCs besonders für den klinischen Einsatz, z.B. bei Vakzinierungstherapien, interessant sein, da sie einerseits Reifemerkmale zur Antigenpräsentation aufweisen und andererseits noch die Fähigkeit zur Antigenaufnahme (Phagozytose) besitzen.

### 5.3. Funktionelle Beurteilung der DCs

Zu den funktionellen Eigenschaften von DCs gehören vor allem die Induktion von Antigen spezifischen T-Zell-Antworten und die Fähigkeit zur Antigenaufnahme, welche wir in dieser Arbeit untersuchten.

Rothenfusser et al. beschrieben 2004 Peptid spezifische zytotoxische T-Zell-Antworten und die Expansion von Memory-CD8<sup>+</sup>-Zellen auf die Stimulation von plasmazytoiden DCs mit CpG-A. Es konnte jedoch keine direkte Aktivierung von T-Zellen durch CpG-Oligonukleotide festgestellt werden. Durch Inkubation mit CpG-B-Oligonukleotiden zeigte die Arbeitsgruppe sogar eine naive Melan-A spezifische CD8<sup>+</sup>-Zell-Antwort. In der vorliegenden Arbeit wurden mMoDCs und das Peptid K-ras-12V für die Induktion einer naiven T-Zell-Antwort verwendet. Es konnten in 2 von 6 Versuchen bei den CpG-B-CM gereiften DCs spezifische IFN- $\gamma$ -Antworten beschrieben werden. Wir konnten somit nicht eindeutig sagen, ob es sich um reproduzierbare und robuste naive T-Zell-Antworten handelte oder möglicherweise um Artefakte.

Die Phagozytose-Untersuchungen zeigten, dass die CC-DCs ihre Fähigkeit zur Phagozytose verloren hatten und Dextran-FITC nicht mehr aufnahmen. Die CpG-CM und UM ausgereiften DCs wiesen eine hohe Phagozytose-Aktivität auf. Dabei führten die CpG-B-CM-Kulturbedingungen durchschnittlich zur

höchsten Aufnahme von Dextran-FITC. Es bleibt letztendlich unklar, welche DCs sich für eine *in vivo* Anwendung besser eignen würden. Möglicherweise wären diejenigen DCs am besten geeignet, die sowohl Antigene per Phagozytose aufnehmen können als auch DC spezifische Marker aufweisen (kostimulierende und Antigen präsentierende Moleküle).

#### 5.4. Zytokinprofile der konditionierten Medien und der DC-Kulturen

Die Zytokinproduktion von MoDCs durch Stimulation mit CpG-CM oder BeCM+SyCM wurde bisher nicht eingehend untersucht, da auch hier aufgrund der mangelnden TLR9-Expression keine Aktivierung und somit auch keine Zytokinsekretion zu erwarten war. Wir konnten in der vorliegenden Arbeit nachweisen, dass PBMCs eine Zytokinproduktion nach Stimulation mit bakteriellen Extrakten und CpG-Oligonukleotiden zeigten. Im SyCM stellten sich besonders ausgeprägt die Zytokine dar, die MoDCs aktivieren können und auch im CC vorhanden waren. Das Nachweisverfahren mittels Zytokin-Membranen erlaubte allerdings keine Aussagen zu absoluten Zytokinmengen sondern nur relative Angaben.

Elkord et al. beschrieben 2005, dass die MoDC-Gewinnung per Plastik-Adhärenz sich vorteilhafter auf die Zytokinproduktion und Oberflächenexpression (CD80, CD83, CD86) auswirkte als die DC Generierung durch CD14<sup>+</sup>-Isolation. Besonders IL-12, IL-10 und TNF- $\alpha$  wurden stärker sezerniert. In unserer Arbeit zeigten sich ebenfalls nach Ausreifung der imMoDCs per Plastikadhärenz kennzeichnende Zytokinprofile:

In den DC-Kulturüberständen befanden sich am Tag 7 die höchsten Anteile von Zytokinen bei den CC gereiften DCs (wie z.B. IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-7, MIP-3 $\alpha$ , MIP-3 $\beta$  und TNF- $\alpha$ ), was teilweise durch die direkte Zytokinzugabe (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PG-E<sub>2</sub>, IL-6) am Tag 5 zur DC-Aktivierung bedingt war. In den BeCM+SyCM gereiften DCs war ebenfalls ein interessantes Zytokinprofil vorhanden: IL-6, IL-12p70 und IL-10 wurden am stärksten von allen Kulturbedingungen sezerniert. Es seien hier nur einige der relevanten Zytokine zur DC-Ausreifung, T-Zell-Aktivierung oder Zellproliferation aus unserer Arbeit nochmals erwähnt:

**IL-6** ist ein klassisches proinflammatorisches Zytokin in der Akutphasereaktion und ist für das Zellwachstum sowie zur Zelldifferenzierung verantwortlich. IL-6 wurde in unserer Arbeit am stärksten im BeCM+SyCM sezerniert. In den DC-Kulturüberständen war es in allen Kulturbedingungen etwa gleich stark vorhanden.

**IL-10** dagegen begrenzt die Entzündungsreaktion, indem es IL-12 inhibiert und das Wachstum sowie die Differenzierung verschiedener Zellen reguliert. Wir konnten es bei den konditionierten Medien verstärkt im CpG-B-CM nachweisen und bei den DC-Kulturüberständen war es in höchsten Anteilen im

BeCM+SyCM vorhanden.

**IL-12p70** ist wiederum ein proinflammatorisches Zytokin, welches für die Produktion von IFN- $\gamma$  und anderen Zytokinen der NK- und T-Zellen essentiell ist. Wir detektierten im Überstand der BeCM+SyCM-DCs die höchsten Mengen an IL-12p70 unter allen DC-Kulturüberständen (sogar höhere Anteile als bei den CC-DCs). Bei den konditionierten Medien wurde IL-12p70 im CpG-B-CM am stärksten sezerniert.

Wagner et al. zeigten 2004, dass plasmazytoide DCs und B-Zellen vermehrt IL-12p70 durch Stimulation mit CpG-Oligonukleotiden und CD40-Liganden produzierten. Weiterhin testeten sie die kombinierte Stimulation von B-Zellen mit E.coli-DNA und CpG-Oligonukleotiden, welche einen synergistischen Einfluss auf die Zytokinproduktion hatte.

**TNF- $\alpha$**  ist ein bedeutendes DC aktivierendes Zytokin, was auch für Antitumoreffekte verantwortlich gemacht wird. TNF- $\alpha$  war im SyCM am höchsten nachweisbar (deutlich höher als in anderen konditionierten Medien). Bei den DC-Kulturüberständen war es jedoch im CC-Kulturüberstand am stärksten vorhanden, was sicher durch die direkte TNF- $\alpha$ -Zugabe erklärbar ist. Es bleibt unklar, welcher Anteil von den DCs produziert wurde und was der zugegebenen Menge entsprach.

In unserer Arbeit erreichten wir eine Stimulation von MoDCs durch konditionierte Medien aus bakteriellen Extrakten und CpG-Oligonukleotiden. Insbesondere konnten vergleichsweise hohe DC aktivierende, antitumorale und proinflammatorische Zytokinmengen in den konditionierten Medien aus den bakteriellen Extrakten (BeCM+SyCM) detektiert werden.

Die meisten Arbeitsgruppen bezogen sich in ihren Zytokinanalysen auf die plasmazytoiden DCs. Es wurde bisher keine Aktivierung durch CpG-Oligonukleotide bei MoDCs und folglich auch keine Zytokinproduktion durch MoDCs beschrieben. Mit dieser Arbeit konnten wir eine Aktivierung und Zytokinausschüttung von MoDCs durch Stimulation mit konditionierten Medien aus CpG-Oligonukleotiden und bakteriellen Extrakten erreichen, wie sie bisher in keiner veröffentlichten Arbeit beschrieben wurden. Zwar lagen die Zytokin-Anteile in den DC-Kulturüberständen teilweise nur knapp über der Nachweisgrenze, es waren jedoch häufig klare Abgrenzungen zur unstimulierten Probe erkennbar, so dass von einer Zytokinproduktion aufgrund der zugegebenen Stimuli ausgegangen werden kann. Es lässt sich jedoch nicht differenzieren, ob die Zytokine vermehrt/vermindert sezerniert, die Produktion von anderen Zytokinen gehemmt/gefördert wurde oder ob ein verstärkter Abbau stattfand. Zusätzlich haben wir weitere Zytokine und Chemokine untersucht, die bisher in dieser Weise noch nicht analysiert wurden (wie z.B. IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IP-10, MCP-1, MCP-3, MIP-3 $\alpha$ , MIP-3 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ). Diese spielen ebenfalls eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit der DC-Aktivierung oder zur Induktion spezifischer T-Zell-Antworten (siehe Tabelle 2, Einleitung).



### 5.5. Klinischer Ausblick: CpG-Oligonukleotide in der Therapie von Tumoren und Infektionskrankheiten

Seit der Einführung von Vakzinierungen besteht ein Interesse, die Qualität von Impfungen zu verbessern oder Impfungen auch in der Tumorthherapie einzusetzen. Dabei stellen CpG-Oligonukleotide ein Adjuvans bei herkömmlichen Vakzinen durch Aktivierung von Antigen präsentierenden Zellen und durch Förderung der Antikörperproduktion bei prophylaktischen oder therapeutischen Impfungen dar (Kovarik et al. 1999, Brazolot et al. 1998).

Einige Studien haben gezeigt, dass ODN 2006 (CpG-B) als Vakzine-Adjuvans bei Primaten die Entwicklung einer humoralen Immunantwort fördert (Hartmann und Krieg 2000, Jones et al. 1999). Die Anwendungsmöglichkeiten als Immunadjuvans scheinen daher vielversprechend zu sein.

Weiterhin scheinen CpG-Oligonukleotide weitaus verträglicher zu sein, als andere Adjuvantien, wie z.B. CFA (Freund's complete adjuvant), da selektiv nur die Zielzellen durch CpG-Oligonukleotide aktiviert werden. Durch CFA werden sehr hohe Mengen proinflammatorischer Zytokine und Chemokine ausgeschüttet, die gewebstoxische Nebenwirkungen verursachen können.

Durch die CpG abhängige Aktivierung unspezifischer Effektorzellen (NK-Zellen, Makrophagen) wird die Antikörper abhängige Zytotoxizität verstärkt. Das Immunsystem wird durch die Anwesenheit von CpG-Oligonukleotiden ständig stimuliert und wäre theoretisch somit in der Lage, Tumoren effizienter zu bekämpfen. Sfondrini et al. konnten 2002 zeigen, dass CpG-Oligonukleotide die Inzidenz und die Zahl der Tumoren in weiblichen Mäusen, die spontan Mammakarzinome entwickelten, signifikant verringerten.

## 6. Zusammenfassung

---

Dendritische Zellen (DCs), die zur Antigenaufnahme und -präsentation fähig sind, nehmen eine Schlüsselrolle in der Auslösung einer spezifischen zellulären Immunantwort ein. Daher stehen sie im Fokus vieler Forschungsansätze, die durch Modulation der spezifischen Immunantwort nach neuen therapeutischen Erfolgen suchen. Während der letzten Jahre wurden verschiedene Subpopulationen von DCs beschrieben, die die phänotypische und funktionelle Heterogenität der DCs deutlich machen.

Um die Rolle und Funktion von verschiedenen DC-Populationen im Immunsystem besser zu verstehen und immuntherapeutisch zielgerichteter einzusetzen, ist es notwendig, die verschiedenen DC-Populationen anhand von definierten und damit vergleichbaren Charakteristika zu analysieren. Ziel dieser Arbeit war es, durch unterschiedliche Ausreifungsstimuli verschiedene DCs *in vitro* zu generieren und sie anhand ihrer phänotypischen und funktionellen Eigenschaften zu vergleichen. Im Rahmen eines Gesamtprojektes sollte diese Dissertation alternative Verfahren aufzeigen, um kosteneffizient DCs mit verschiedenen Phänotypen und Funktionen zu entwickeln, um somit weitere klinische Anwendungen von DCs zu ermöglichen.

Vorraussetzung für den Einsatz von DCs in der Immuntherapie ist, dass sie in ausreichend hoher Zellzahl isoliert werden können. Zu diesem Zweck wurden im ersten Schritt humane unreife DCs aus Monozytenkulturen mit unterschiedlichen konditionierten Medien ausgereift. Die konditionierten Medien wurden zuvor aus Kurzzeitkulturen von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) unter Zusatz von bakteriellen Extrakten oder immunstimulatorischer DNA (CpG-Oligonukleotiden) gewonnen.

Die vergleichende Analyse der unterschiedlich *in vitro* ausgereiften DCs umfasste die durchflusszytometrische Phänotypisierung, die Messung der Induktion von Antigen spezifischen und unspezifischen Lymphozytenproliferationen in gemischten DC/Lymphozytenkulturen sowie die Fähigkeit zur Endozytose von Antigenen. Ergänzt wurde die Charakterisierung der DCs durch die Zytokinanalyse der konditionierten Medien und DC-Kulturen.

In den aktuellen Verfahren werden DCs meist mithilfe eines Zytokin-Cocktails (CCs) ausgereift, die in unserer Arbeit als Referenz-DCs dienten. DCs, die wir mit konditionierten Medien von bakteriellen Extrakten oder CpG-Oligonukleotiden generierten, zeigten eine erhöhte Expression von kostimulierenden und Antigen präsentierenden Molekülen. Wir konnten zeigen, dass die konditionierten Medien DCs aktivieren und ausreifen können und sich darunter stabile DC-Phänotypen ausbildeten. Im Vergleich zu den o.g. CC-DCs zeigten die DCs, die mittels konditionierter Medien ausreift, zudem höhere Anteile an Endozytose-Markern und stärkere Antigenaufnahmen durch Endozytose, während die CC-DCs ihre Fähigkeit zur Endozytose verloren hatten. Wir konnten weiterhin nachweisen, dass sich DC aktivierende,

proinflammatorische und antitumorale Zytokine in den konditionierten Medien und DC-Kulturen befanden, darunter auch die entscheidenden Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6, welche im CC enthalten sind.

Die Ergebnisse unserer Analysen veranschaulichen, dass sich je nach Stimulus unterschiedliche DC-Populationen *in vitro* generieren lassen, die sich durch verschiedene Phänotypen, Morphologien, Funktionen und Zytokinprofile auszeichnen. In weiteren Studien müssen die verschiedenen DC-Populationen auf ihre praktische Nutzbarkeit untersucht werden. Es ist vorstellbar, dass sich einzelne DC-Populationen für spezielle immuntherapeutische Anwendungen eignen. Wo bisherige Therapiestrategien noch unzureichend sind, eröffnet die Entwicklung der DCs aus konditionierten Medien zusätzliche klinische Behandlungsmöglichkeiten. Hierfür könnten je nach Verwendungszweck unterschiedliche DC-Populationen mit den charakteristischen Zytokinprofilen von Interesse sein. In der vorliegenden Arbeit wird ein reproduzierbares und kostengünstiges Verfahren zur *in vitro* Generierung von DCs mit therapeutisch erwünschten Eigenschaften vorgestellt und erweitert somit die denkbar klinische Einsetzbarkeit von DCs.

## 7. Literaturverzeichnis

---

**Agrawal S**, Iadarola PL, Tamsamami J et al.

Effect of G-rich sequences on the synthesis, purification, cell uptake, and hemolytic activity of oligonucleotides

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (1996) 6 (18) 2219-2224

**Albert ML**, Sauter B, Bhardwaj N

Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs

Nature (1998) 392:86-9

**Alijagic S**, Möller P, Artuc M, Jurgovsky K et al.

Dendritic cells generated from peripheral blood transfected with human tyrosinase induce specific T cell activation

Eur J Immunol 1995 (25): 3100-3107

**Ardavin C**.

Thymic dendritic cells

Immunol Today (1997) 18:350-61

**Ballas Z**, Rasmussen W, Krieg A

Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA.

J Immunol (1996) 157:1840-1845

**Bartz H**, Mendoza Y, Gebker M et al.

Polyguanosine strings improve cellular uptake and stimulatory activity of phosphodiester CpG oligonucleotides in human leukocytes

Vaccine (2004) 23:148-55

**Banchereau J**, Briere F, Caux C et al.

Immunobiology of dendritic cells

Annu Rev Immunol (2000) 18:767-811

**Banchereau J**, Steinman RM

Dendritic cells and the control of immunity

Nature (1998) 392:245-52

**Bender A**, Sapp M, Schuler G et al.

Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood

J Immunol Methods (1996) 196:1211-35

**Bennett SR**, Carbone FR, Karamalis F et al.

Induction of a CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4<sup>+</sup> T cell help

J Exp Med (1997) 186:65-70

**Bird AP**

CpG-rich Island and the Function of DNA Methylation

Nature (1986) 321:209-213

**Brazolot Millan CL**, Weeratna R, Krieg AM et al.

CpG DNA induce strong Th1 humoral and cell-mediated immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice

PNAS (1998) 95:15553-8

**Brunner C**, Seiderer J, Schlamp A et al.

Enhanced Dendritic Cell maturation by TNF- $\alpha$  or Cytidine-Phosphate-Guanosine DNA Drives T Cell Activation In Vitro and Therapeutic Anti-Tumor Immune Response In Vivo

Journal of Immunol., 2000, 165:6278-6286

**Cella M**, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K et al.

Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation

J Exp Med (1996) 184:747-52

**Cella M**, Jarrossay D, Facchetti F et al.

Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon

Nat Med (1999) 5:919-23

**Coley WB**, The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases  
Am J Med Sci (1893) 105:487-511

**Davis HL**, Suparto II, Weeratna RR et al.  
CpG DNA overcomes hyporesponsiveness to hepatitis B vaccine in organografts  
Vaccine (2000), 18:1920-1924

**Dalpke AH**, Zimmermann S, Albrecht I et al.  
Phosphodiester CpG oligonucleotides as adjuvants: polyguanosine runs enhance cellular uptake and improve immunostimulative activity of phosphodiester CpG oligonucleotides in vitro and in vivo  
Immunology (2002) 106:102-112

**De Saint-Vis B**, Vincent J, Vandenabeele S et al.  
A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment.  
Immunity (1998) 9:325-36

**Dhodapkar MV**, Steinman RM, Krasovsky J et al.  
Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells  
J Exp Med (2001) 193:233-8

**Elkord E**, Williams PE, Kynaston H et al.  
Human monocyte isolation methods influence cytokine production from in vitro generated dendritic cells.  
Immunology (2005) 114(2):204-12

**Fong L**, Brockstedt D, Benike C et al.  
Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients  
J Immunol. (2001), 166:4254-9

**Gursel M**, Verthelyi D, Klinman DM  
CpG oligodeoxynucleotides induce human monocytes to mature into functional dendritic cells  
Eur J Immunol. 2002 Sep;32(9):2617-22

**Hart DN**, Newton MR, Reece-Smith H et al.  
Major histocompatibility complex antigens in the rat pancreas, isolated pancreatic islet, thyroid, and adrenal  
Transplantation (1983) 36:431-5

**Hart DN**  
Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response.  
Blood (1997) 90:3245-87

**Hartmann G**, Endres S, Rothenfußer S et al.  
CpG-Oligonukleotide: Immuntherapie nach dem Muster bakterieller DNA  
Deutsches Ärzteblatt (1998), 15:A-981/B-813/C-761

**Hartmann G**, Weiner GJ, Krieg AM  
CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells  
Proc Natl Acad Sci USA (1999) 96:9305-10

**Hartmann G**, Krieg AM  
Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary cells  
J Immunol (2000) 247:1-21

**Hartmann G**, Battiany J, Poeck H et al.  
Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN- $\alpha$  induction in plasmacytoid dendritic cells.  
Eur J Immunol (2003) 33:1633-41

**Hawiger D**, Inaba K, Dorsett Y et al.  
Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo  
J Exp Med (2001) 194:769-79

**Hornung V**, Rothenfusser S, Britsch S et al.  
Quantitative expression of Toll-like receptor 1-10mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides

J Immunol. 2002

**Horst Ibelgaufts'**

C O P E , Cytokines & Cells Online Pathfinder Encyclopaedia  
Version 18.0 (November 2006)

**Inaba K**, Inaba M, Romani N, Romani N et al.

Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor

J Exp Med (1992) 176:1693-702

**Inaba K**, Inaba M, Naito M et al.

Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo

J Exp Med (1993) 178:479-88

**Janeway CA jr** und Travers P

Immunologie, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin-Oxford  
1995

**Janeway CA Jr.**

How the immune system protects the host from infection

Microbes Infect.2001 Nov., 3(13) :1167-71 Review

**Jensen KE**, Neal AL, Owens RE et al.

Interferon Responses of Chick Embryo Fibroblasts to Nucleic Acids and Related Compounds

Nature 200 (1963) 433-434

**Jones TR**, Obaldia N, 3<sup>rd</sup>, Gramzinski RA et al.

Synthetic oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance immunogenicity of a peptide malaria vaccine in Aotus monkeys

Vaccine (1999) 17:3065-71

**Jonuleit H**, Schmitt E, Schuler G et al.

Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells

J Exp Med (2000) 192:1213-22

**Kovarik J**, Bozzotti P, Love-Homan L et al.

CpG oligonucleotides can circumvent the Th2 polarization of neonatal responses established by neonatal priming

J Immunol (1999) 161:1611-7

**Krieg AM**, Yi A, Matson S et al.

CpG Motifs in Bacterial DNA Trigger direct B-Cell Activation

Nature (1995) 374:546-549

**Krieg AM**

CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts?

Nat Med. (2003) 7:831-5

**Krieg AM**

CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects

Annu Rev Immunol (2002) 20:709-60

**Krug A**, Rothenfusser S, Hornung V et al.

A new CpG oligonucleotide sequence induces maximal production of IFN- $\alpha$  in plasmacytoid dendritic cells

Eur J Immunol 2001 (31):3026-37

**Krug A**, Towarowski A, Britsch S et al.

Toll like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40L to induce high amounts of IL-12

Eur J Immunol (2001) 31:3026

**Krug A**, Rothenfusser S, Selinger S et al.

CpG-A oligonucleotides induce a monocyte-derived phenotype that preferentially activates CD8 T cells

J Immunol. 2003 Apr 1;170(7):3468-77

**Kugler A**, Stuhler G, Walden P et al.

Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids  
 Nat Med (2000) 6:332-6

**Marshall JD**, Fearon K, Abbate C et al.  
 Identification of a novel CpG DNA class and motif that optimally stimulate B cell and plasmacytoid dendritic cell functions.  
 J Leukoc Biol (2003) 73:781-92

**Mashiba H**, Tomoda H, Furusawa M  
 In Vitro Augmentation of Macrophage-Activating-Factor Release from Peripheral Blood Cells of Cancer Patients by a DNA Fraction from Mycobacterium Bovis BCG  
 Jpn J Med Sci (1990) 43:133-139

**Mayordomo JI**, Zorina T, Storkus WJ et al.  
 Bone marrow derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity  
 Nat Med 1995 Dec; 1(12):1297-302

**McKenzie JL**, Beard ME, Hart DN  
 Depletion of donor kidney dendritic cells prolongs graft survival  
 Transplant Proc (1984) 16: 948-51

**Romani N**, Gruner S, Brabg D et al.  
 Proliferating dendritic cells progenitors in human blood.  
 J Exp Med (1994) 180:83-93

**Romani N**, Reider D, Heuer M et al.  
 Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability  
 J Immunol Methods (1996) 196:137-51

**Rothenfusser S**, Hornung V, Krug A et al.  
 Distinct CpG oligonucleotides sequences activate human gamma delta T cells via interferon-alpha/-beta  
 Eur J Immunol. 2001 Dec;31(12):3525-34

**Rothenfusser S**, Tuma E, Endres S et al.  
 Plasmacytoid Dendritic Cells: The Key to CpG  
 Human Immunol (2002) 63:1111-1119

**Rothenfusser S**, Hornung V, Ayyoub M et al.  
 CpG-A and CpG-B oligonucleotides differentially enhance human peptide specific primary and memory CD8+ T-cell responses in vitro  
 Blood (2004) 103(6):2162-9

**Sallusto F**, Lanzavecchia A  
 Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and down-regulated by tumor necrosis factor alpha  
 J Exp Med (1994) 179: 1109-1114

**Schnurr M**, Then F, Galambos P et al.  
 Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells  
 J Immunol (2000) 165:4704-9

**Sfondrini L**, Besusso D, Rumio C et al.  
 Prevention of spontaneous mammary adenocarcinoma in Her-2/neu transgenic mice by foreign DNA  
 Faseb J (2002) 16:1749-54

**Siegel FP**, Kadowaki N, Shodell M et al.  
 The nature of the principal type 1 interferon-producing dendritic cells in human blood.  
 Science (1999) 284:1835-7

**Steinman RM**, Cohn ZA  
 Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice  
 J. Exp. Med.1974, 137: 1142-1147.

**Steinman RM**, Witmer MD  
 Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice

Proc Natl Acad Sci USA 1978 Oct;75(10):5132-6

**Steinman RM**

The dendritic cell system and its role in immunogenicity

Annu Rev Immunol (1991) 9:271-96

**Steinman RM**, Swanson J

The endocytic activity of dendritic cells

J Exp Med (1995) 182:283-8

**Thurnher M**, Papesh C, Ramoner R et al.

In vitro generation of CD83+ human blood dendritic cells for active tumor immunotherapy.

Exp Hematology 1997 (25): 232-237

**Thurner B**, Haendle I, Roder C et al.

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) 190:1669-78

**Timmerman JM**, Czerwinski DK, Davis TA et al.

Idiotypic-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma clinical and immune responses in 35 patients

Blood 2002 Mar 1;99(5):1517-26

**Tokunaga T**, Yamamoto H, Shimada S et al.

Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. I. Isolation, physicochemical characterization and antitumor activity

J Natl Cancer Inst (1984) 72:955-62

**Vollmer J**, Weeratna R, Payette P et al.

Characterization of three oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities

Eur J Immunol (2004) 34:251-62

**Wagner M**, Poeck H, Jahrsdoerfer B et al.

IL-12p70-dependent Th1 induction by human B cells requires combined activation with CD40 ligand and CpG DNA

J Immunol (2004) 172:954-963

**Yamamoto S**, Kuramoto E, Shimada S et al.

In Vitro Augmentation of Natural Killer Cell Activity and Production of Interferon-alpha/beta and -gamma with Deoxyribonucleic Acid Fraction from Mycobacterium Bovis BCG

Jpn J Cancer Res (1988) 866-873

**Zhou LJ**, Tedder TF

Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily

J Immunol (1995) 154:3821-35

**Zitvogel L**, Mayordomo JJ, 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.

**Zobywalski A**, Javorac M, Frankenberger B

Generation of clinical grade dendritic cells with capacity to produce biologically active IL-12p70

J Trans Med (2007) 18:1-16



## 8. Danksagung

---

Zu Beginn möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Thiel für die Möglichkeit, meine Dissertation in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie an der Charité - Campus Benjamin Franklin, Medizinische Klinik III, durchzuführen, bedanken.

Meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. med. Scheibenbogen, bin ich für ihre stetige Ansprechbarkeit und ihre positiven Ratschläge besonders verbunden. In ihrer Arbeitsgruppe profitierte ich von den überaus professionellen Arbeitsbedingungen und der herzlich kollegialen Atmosphäre.

Herrn Dr. med. Kang-Hun Lee, meinem Betreuer, danke ich ganz herzlich für die Überlassung des vorliegenden Themas, für seine ausführliche Hilfestellung und seine wertvollen Anregungen. Mit Unterstützung Dr. med. Kang-Hun Lees und anderer Doktoranden - Christian Kolbe, Agnieszka Wieczorek, Benjamin Günther - war es mir möglich, wissenschaftliche Experimente selbstständig durchzuführen bzw. im Team neue Ergebnisse und daraus resultierende Fragestellungen im Zusammenhang mit anderen Projekten zu diskutieren und neue Experimente zu planen. Ebenso gilt mein Dank unserer MTA, Frau Hyun Seung Kang, für ihre engagierte Mitarbeit und Unterstützung an unseren Projekten.

Sehr zu schätzen weiß ich die Zuverlässigkeit und kurzfristige Erreichbarkeit all unserer Blutspender. Für viele wertvolle Hinweise und Verbesserungsvorschläge bin ich meinen Freundinnen Sandra Kupfer, Annett Stahn und Herrn Prof. Dr. med. Ralf Tunn sowie seinen Mitarbeitern des Deutschen Beckenbodenzentrums, an dem ich ein Jahr tätig war, außerordentlich dankbar.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern und meinen Geschwistern, die mir dieses Studium ermöglicht und mich immer liebevoll unterstützt haben.

## **9. Lebenslauf**

---

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

### **Erklärung an Eides Statt**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter unter der Nutzung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur verfasst habe.

Die Arbeit enthält auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten.

Baden, den 12.04.2009

Mareen Reichert