

Aus dem
Deutschen Diabetes Forschungsinstitut
der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Werner A. Scherbaum

**Generierung und Charakterisierung einer kontinuierlich
proliferierenden dendritischen Zelllinie der NOD-Maus**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Thilo Krüger

2003

Aus dem
Deutschen Diabetes Forschungsinstitut
der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Werner A. Scherbaum

**Generierung und Charakterisierung einer kontinuierlich
proliferierenden dendritischen Zelllinie der NOD-Maus**

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. phil. Alfons Labisch, M.A., Dekan

Referent: Priv. Doz. Dr. med. Jochen Seißler

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Rainer Haas

vorgelegt von

Thilo Krüger

2003

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1 Der Typ-I-Diabetes und seine Pathogenese beim Menschen	4
1.2 Das NOD-Mausmodell	6
1.3 Dendritische Zellen	9
2. Material und Methoden	16
2.1 Reagenzien und Puffer	16
2.2 Methoden	20
2.2.1 Kulturmedium	20
2.2.2 Fibroblastenkultur	20
2.2.3 Generation der Zelllinie dendritischer Zellen	20
2.2.4 Präparation von dendritischen Zellen aus Knochenmark	22
2.2.5 Charakterisierung der dendritischen Zellen	23
2.2.5.1 Durchflusszytometrische Analysen der Oberflächenmarker	23
2.2.5.2 Analyse des Phänotyps der dendritischen Zellen nach der Zellaktivierung	27
2.2.5.3 Detektion von intrazytoplasmatischen Antigenen	28
2.2.5.4 Analyse der funktionellen Aktivität der dendritischen Zellen	28
2.2.5.4.1 Bestimmung der Pinozytose und Phagozytoseaktivität	28
2.2.5.4.2 Analyse der Zytokinproduktion	29
2.2.5.4.3 Stimulation allogener T-Lymphozyten in einer gemischten Leukozytenreaktion (MLR)	31
2.2.5.4.4 Messung der Zytokinproduktion der T-Zellen nach MLR	32
2.2.6 Statistische Auswertung	33
3. Ergebnisse	34
3.1 Generierung der dendritischen Zelllinie NOD-DC1	34
3.2 Herstellung von dendritischen Zellen aus Knochenmark	36
3.3 Durchflusszytometrische Auswertung der dendritischen Zelllinie NOD-DC1	37
3.4 Durchflusszytometrische Analyse von Knochenmark – DC`s	44
3.5 Untersuchung zur Antigenaufnahme der dendritischen Zellen	46
3.5.1 Darstellung der Pinozytoseeigenschaft der dendritischen Zellen	46
3.5.2 Phagozytose	48
3.6 Ermittlung der Zytokinproduktion der Linie NOD-DC-1 mittels ELISA	51
3.7 Durchführung einer gemischten Leukozytenreaktion	59
3.8 Untersuchung der Zytokinantwort der Lymphozyten nach MLR	60
4. Diskussion	62
4.1 Ausblick	71
5. Literaturverzeichnis	73
6. Danksagung	90
7. Lebenslauf	91
8. Zusammenfassung	93

1. Einleitung

1.1 Der Typ-1-Diabetes und seine Pathogenese beim Menschen

Der Diabetes mellitus ist gekennzeichnet durch eine Störung des Glukosestoffwechsels mit pathologisch erhöhtem Serumglukosespiegel. Der Typ 1 Diabetes resultiert aus einer Destruktion der insulinproduzierenden β -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas. Etwa 90% der Fälle entstehen durch eine autoimmune Zerstörung der Betazellen (Typ 1a Diabetes), 10% werden als nicht immunogene, idiopathische Form bezeichnet (Typ 1b Diabetes), d.h. hier ist die Pathogenese bisher unbekannt (ADA Klassifikation 1997). Hiervon abzugrenzen ist der Typ 2 Diabetes, bei dem sowohl eine Störung der Insulinsekretion als auch eine periphere Insulinresistenz eine wichtige Rolle spielen. Zur Zeit sind in Deutschland etwa 8% der Bevölkerung am Diabetes mellitus erkrankt. Davon entfallen etwa 10% auf den Typ 1 des Diabetes.

Durch das Polypeptid Insulin wird die Aufnahme von Glukose in die Zelle vermittelt. Dies geschieht über die Bindung von Insulin an den zellmembranständigen Insulinrezeptor, wobei durch Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsvorgänge verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege aktiviert werden, die die Proteinbiosynthese von Glukosetransportern, insbesondere des insulinabhängigen GLUT 4, sowie die Lipidsynthese und Glykogensynthese steuern. Diese Glukosetransporter werden in die Zellmembran integriert und ermöglichen die Aufnahme von freier Glukose in die Zelle. Eine insulinunabhängige Aufnahme von Glukose in das Zellinnere ist nur in wenigen Organen wie der Leber möglich, wo insulinunabhängige Glukosetransporter existieren.

Die Pathogenese des Diabetes Typ 1a ist zur Zeit noch nicht eindeutig geklärt. Es werden verschiedene Mechanismen, beziehungsweise eine Kombination mehrerer Faktoren diskutiert. Die autoimmune Zerstörung der Inselzellen tritt gehäuft bei Menschen mit bestimmten genetischen Merkmalen auf. In genomweiten Untersuchungen wurden bisher 18 Risikogene identifiziert (IDDM1-IDDM18) (Todd et al., 1995, Schranz et al., 1998, Bach et al., 2001). Die stärkste Assoziation besteht mit bestimmten Subtypen der HLA Moleküle (Human Leukocyte Antigen), die bei der Maus MHC (Major Histocompatibility Complex) genannt werden. Diese Moleküle stellen membranständige Proteinkomplexe dar, die die Fähigkeit besitzen, in einer aus einer α - und einer β -Kette gebildeten Mulde Peptide dem T-Zellrezeptor von T-Lymphozyten zu präsentieren und somit eine spezifische Immunreaktion zu initiieren. In Studien wurde gezeigt, dass HLA-Gene in bis zu 40 % für die familiäre Häufung des Diabetes Typ 1 verantwortlich sind (Davies et al., 1994). Familiäre und geographische

Risikostudien untermauern die Relevanz der HLA-Moleküle (Atkinson et al., 1994; Redondo et al., 1999; Kaprio et al., 1992; Muntoni et al., 1997). Folgende HLA-Subtypen sind demnach mit einem besonders hohem Risiko, einen Diabetes Typ 1 zu entwickeln, assoziiert: HLA DQA1*0501-DQB1*0201 und DQA1*0301-DQB1*0302. Über 90% der Patienten mit Typ I Diabetes tragen einen dieser Marker. Patienten, die beide Haplotypen aufweisen, tragen ein besonders hohes Diabetesrisiko (Tisch et al., 1996).

Andere Studien belegen, dass Infektionserreger die Diabetesentstehung triggern oder fördern können. Insbesondere Viren können sowohl durch direkten Befall der β -Zellen, als auch durch Initiation eines autoimmunen Geschehens zu einer Schädigung der insulinproduzierenden Zellen führen können (Szopa et al., 1993; Yoon et al., 1979). Eine besondere Rolle spielen Infektionen mit Coxsackievirus B, Mumps, Eppstein-Barr-Virus und Zytomegalievirus (Foulis et al., 1997).

Als Zielantigene der Autoimmunreaktion beim Typ 1 Diabetes konnten in den letzten Jahren mehrere Proteine identifiziert werden. Zu den wichtigsten Vertretern zählen Insulin, Inselzellantigen-2 (I-A2) und das Enzym Glutaminsäure Decarboxylase mit einem Molekulargewicht von 65 kDa, genannt GAD65. Es konnte gezeigt werden, dass Lymphozyten aus dem Blut von frisch manifesten Typ 1 Diabetikern mit Insulin reagieren (Miller et al., 1987; Naquet et al., 1988). Verwandte ersten Grades zeigen ebenfalls dieses Phänomen (Keller, 1990). Vergleichbares ließ sich in Bezug auf GAD65 nachweisen (Atkinson et al., 1992; Harrison et al., 1993), wobei die Immunreaktion gegen dieses Protein eine besondere Rolle zu Beginn der Erkrankung zu spielen scheint. Darüber hinaus ist erkannt worden, dass die bei dem Diabetes mellitus Typ 1 bekannten Autoantikörper, die zytoplasmatischen Inselzellantikörper (ICA), mit GAD65 und IA-2 reagieren (Baekkeskov et al., 1990; Christie et al., 1994).

Die Krankheitsentwicklung des Typ 1 Diabetes erstreckt sich über viele Monate bis Jahre, in denen der Patient asymptomatisch ist und einen euglykämischen Metabolismus aufweist. Dies ist darauf zurückzuführen, dass eine beginnende Zerstörung der β -Zellen in bezug auf die Insulinsekretion durch verbleibende, intakte Zellen kompensiert werden kann. Zur Zeit herrscht Unklarheit über das Ausmaß der β -Zellzerstörung, ab dem sich der Diabetes manifestiert. Es ist eine gängige Auffassung, dass etwa 90% der insulinproduzierenden Zellen zerstört sein müssen, um den Diabetes symptomatisch werden zu lassen. Neuere Forschungsergebnisse an Pavianen mit dem β -zelltoxischen Präparat Streptozotocin zeigen allerdings, dass bereits eine Zerstörung von 50 bis 70% ausreicht, einen Typ 1 Diabetes klinisch erfassbar zu machen (McCulloch et al., 1991). Inwieweit bei diesem Versuch andere,

beim humanen Diabetes nicht auftretende Mediatoren oder Zytokine eine Rolle spielen, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

1.2 *Das NOD-Mausmodell*

Die NOD (non obese diabetic) - Maus wurde erstmalig in den 70er Jahren des vergangenen Jahrhunderts in Japan beschrieben. Diese Mäuse entwickeln einen autoimmunen Diabetes, der dem humanen Typ 1 Diabetes ähnlich und vergleichbar ist. Wichtigstes Korrelat des Diabetes der NOD-Maus ist das Auftreten einer Insulinitis, einer Infiltration des Pankreas mit autoreaktiven mononukleären Zellen, was zu einer Zerstörung der β -Zellen des pankreatischen Inselgewebes führt (Atkinson und McLaren, 1994). Größere Abweichungen des Tiermodells bestehen darin, dass vorwiegend weibliche Individuen erkranken und die Tiere in einer apathogenen Umgebung gehalten werden müssen.

Ähnlich dem humanen Diabetes existieren mehrere prädisponierende genetische Faktoren, die mit der Entstehung des Diabetes mellitus der NOD-Maus in Verbindung gebracht werden. Von besonderer Bedeutung ist der Genlocus Idd-1, der für die MHC II Moleküle der Maus kodiert (Hattori et al., 1986; Prochazka et al., 1987; Livingstone et al., 1991). Hier besteht eine direkte Parallele zum humanen Diabetes. Das murine MHC II Molekül mit der Bezeichnung I-A^{g7} weist bemerkenswerte Übereinstimmungen mit dem humanen MHC Allel DQB*0302 auf (Kwok et al., 1996). Als pathologisches Korrelat wird das Fehlen der Aminosäure Aspartat in der β -Kette dieses Moleküls angenommen, da sämtliche andere murine MHC-Moleküle an entsprechender Stelle Aspartat aufweisen. Sowohl bei dem MHC-Molekül I-A^{g7} als auch bei dem humanen Allel kann ein Hitzeschockprotein, hsp60, eine Dimerisation und somit eine Beeinträchtigung der Funktion des MHC Moleküls bewirken, jedoch nicht bei anderen I-A- oder DQ-Molekülen (Reizis et al., 1997). Bestätigt wird dies durch die Beobachtung, dass eine Injektion von hsp60 oder ein Polypeptid aus dessen Aminosäuren 437 – 460 eine Exazerbation des Diabetes bewirkt (Elias et al., 1995). Darüber hinaus zeigt das I-A^{g7}-Molekül eine ausgeprägte Schwäche bei der Bindungsstärke zu Peptiden. In Bindungsversuchen mit radioaktiv markierten Peptiden an I-A^{g7} zeigte sich eine Bindungsrate von lediglich 1% (Carrasco-Marin et al., 1997), die Halbwertszeit von I-A^{g7} in der SDS-PAGE betrug 5,5 h (Carrasco-Marin et al., 1997). Auch diese Phänomene wurden bei oben erwähntem humanen MHC-II Molekül gefunden (Johansen et al., 1996; Buckner et al., 1996). Bei einem weiteren MHC-II Allel, I-A^k, fanden sich ähnliche Eigenschaften, wenngleich nicht derart ausgeprägt, wie bei I-A^{g7}. Die Halbwertszeit von I-A^k in der SDS-

PAGE betrug 8 bis 22 Std. (Nelson et al., 1993, 1994). Diese Funktionseinschränkungen waren nachweislich nicht auf eine Denaturierung oder Dissoziation der Untereinheiten zurückzuführen (Carrasco-Marin et al., 1996). Die Bedeutung dieser Ergebnisse bleibt allerdings Spekulation. So könnte eine schwache Präsentationskapazität der Antigen präsentierenden Zellen (APC: engl.: antigen presenting cells) zu einer reduzierten negativen Selektion im Thymus führen und somit zu einer erhöhten Zahl vorhandener, autoreaktiver Lymphozyten.

Bei der NOD-Maus konnten verschiedene Defekte in der Regulation der Immunantwort nachgewiesen werden. Beschrieben wurde eine generelle verminderte Sekretion von IL-1 und IL-4 (McAuthor et al., 1993; Taylor-Robinson et al., 1994, Rapoport 1993), eine erhöhte Sekretion von Prostaglandin E-2 (PGE2) (Robinson et al., 1993) und eine gestörte T-Zell Apoptose (Chervonsky et al., 1999). Es wird vermutet, dass diese Defekte zusammengenommen das Auftreten und die Aktivierung autoreaktiver T-Lymphozyten fördern.

Der Diabetes der NOD Maus beginnt durchschnittlich im Alter von 3-4 Wochen mit der Infiltration der Langerhans'schen Inseln durch Einwandern von dendritischen Zellen und Makrophagen (Jansen et al., 1994). Anschließend folgen autoreaktive T-Lymphozyten, die wie beim Menschen unter anderem gegen Insulin und GAD65 gerichtet sind und eine Hauptrolle bei der progredienten autoimmunen Zerstörung der β -Zellen einnehmen (Roep 1996, Wegmann et al., 1994, Elias et al., 1997, Daniel 1995, Wong 1999). Unterstützt wird diese Hypothese durch Erkenntnisse, dass NOD-Mäuse, denen rekombinantes IL-1 injiziert wurde, keinen Diabetes entwickeln (Jacob et al., 1990).

Die Hypothese der autoimmunen Genese der Insulinitis wird dadurch gestützt, dass sich mittels Transfer von Lymphozyten einer erkrankten Maus auf ein nicht erkranktes Tier der Diabetes übertragen lässt (Bach, 1994, Wegmann et al., 1993, Chervonsky et al., 1997b). Experimente zeigten, dass sowohl CD 4- als auch CD 8-Lymphozyten übertragen werden müssen, um in einer syngenen Maus Diabetes hervorzurufen (Bendelac et al., 1987, Wicker et al., 1986). Auf der anderen Seite kann jede Lymphozytengruppe allein den Diabetes in eine sogenannte NOD-*scid*-Maus übertragen, ein Mausmodell, welches genetisch der NOD Maus entspricht, aber keine T- und B-Lymphozyten besitzt (Peterson and Haskins, 1996, Wong et al., 1996). Zahlreiche Studien konnten übereinstimmend zeigen, dass die Diabetesentwicklung vom Auftreten autoreaktiver T-Lymphozyten der Subpopulation T-Helfer 1 (Th1) abhängig ist (Liblau et al., 1995, Elias et al., 1997). Die Th1 Zellen produzieren die Zytokine IL-2 und

Interferon- γ , welche dendritische Zellen und Makrophagen stimulieren und die Aktivierung CD 8-positiver, zytotoxischer T-Zellen fördern, was zu einer Zerstörung des Zielgewebes führt. Th-2 Zellen sind charakterisiert durch die Produktion von IL-4, IL-10 und IL-13 und vermitteln B-Zellen Hilfestellung bei der Antikörperproduktion. Wichtig ist, dass sich die Th1 und Th2 Zellen durch die sezernierten Zytokine gegenseitig hemmen (Kolb 1997, Nicholson 1996). Die Bedeutung der Th1/Th2 Balance konnte in Studien mit transgenen NOD Mäusen belegt werden. Tiere, deren T-Zellen ein bestimmtes Inselzellantigen erkennen, werden diabetisch, wenn die T-Zellen einen Th1 Phänotyp aufweisen, während Th2 Zellen mit identischen T-Zellrezeptor protektiv wirken (Katz 1995). Eine Störung des Gleichgewichts zwischen Th1 und Th2 Zellen konnte auch beim Typ 1 Diabetes des Menschen nachgewiesen werden (Schloot et al., 1998, Kallan et al., 1997, Kallmann et al., 1999). Da aber in der NOD Maus und beim Menschen immer auch autoreaktive Th2 Zellen nachweisbar sind, wird verständlich, dass den autoreaktiven T-Zellen auch gleichzeitig Autoantikörper gegen die gleichen Antigene aufweisen (Schranz et al., 1998).

Neben der Klärung der grundlegenden Mechanismen der T-Zellimmunantwort beim Typ 1 Diabetes konnten Studien bei der NOD Maus auch einen wichtigen Beitrag für die Entwicklung von Präventionsstrategien leisten. In verschiedenen Interventionsstudien konnten durch subkutane oder orale Immunisierungen mit Insulin und GAD die Diabetesentwicklung bei der NOD Maus signifikant verzögert und reduziert werden (Tian et al, 1996, Tisch et al., 1993, Kaufman et al., 1993, Elias et al., 1997). Dies erfolgte entweder durch die Entwicklung einer T-Zellanergie oder durch die Induktion von regulatorischen T-Zellen, die die diabetogenen, autoreaktiven Th1-Lymphozyten aktiv supprimieren (Tisch et al., 1998, Roncarlo et al., 2000). Allerdings sind die bisherigen Versuche bei Prädiabetikern, wie z.B. die parenterale Immunisierung mit Insulin in der DPT-1 Studie, allesamt enttäuschend verlaufen. Dies könnte auf die Unterschiede in der Antigenkonzentration und dem Zeitpunkt der Immunisierung zurückzuführen sein. Es besteht deshalb weiter ein sehr hohes Interesse, neue Strategien zu entwickeln, mit denen möglichst antigenspezifisch der Autoimmunprozess so moduliert werden kann, dass die Diabetesentstehung komplett verhindert wird.

1.3 Dendritische Zellen

Effektorzellen der erworbenen Immunität sind insbesondere T- und B-Lymphozyten. Ihre alleinige Präsenz im Organismus führt jedoch nicht zu einer Immunreaktion. Es bedarf einer weiteren Population an Zellen, die die Immunreaktion initiiert. Diese zweite Gruppe umfasst die sogenannten Antigen-präsentierenden Zellen. Zu dieser Gruppe zählen dendritische Zellen und Makrophagen. Der Name dendritische Zelle leitet sich von der Morphologie der Zellen ab, die sowohl bei der mikroskopischen Betrachtung von Gewebepreparaten als auch in der Zellkultur zu beobachten ist. Es sind lange zytoplasmatische Zellausläufer zu erkennen, die der Interaktion mit weiteren Zellen des Immunsystems dienen. Der erste Vertreter dieser Zellpopulation sind die Langerhans Zellen der Haut, die erstmals im Jahr 1868 beschrieben worden sind. Die genaue Charakterisierung der dendritischen Zellen begann allerdings erst vor etwa 30 Jahren.

B-Lymphozyten sind in der Lage, Antigene direkt zu erkennen und spezifische Antikörper zu produzieren und zu sezernieren. T-Lymphozyten hingegen benötigen zur Aktivierung APC's, die die entsprechenden Antigene prozessieren und auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. Diese Interaktion findet zwischen den MHC Molekülen der dendritischen Zellen und den T-Zell-Rezeptoren auf der Oberfläche der T-Zellen statt. Auf der Ebene der MHC Moleküle unterscheidet man zwei Typen: MHC Klasse I, was an CD 8-positive T-Lymphozyten bindet und MHC Klasse II, das sich mit dem T-Zell-Rezeptor CD 4-positiver T-Lymphozyten verbindet. Durch zusätzliche Interaktion mit kostimulierenden Signalen und Zytokinen werden die T-Lymphozyten aktiviert, was im Falle der CD 8-positiven T-Lymphozyten zu einer zellulären Immunantwort führt, bei CD 4-positiven T-Lymphozyten hingegen nach der Aktivierung von B-Zellen die Produktion von Antikörpern unterstützt oder CD 8-Zellen und APC aktiviert.

Dendritische Zellen besitzen eine herausragende Rolle bei der Induktion einer Immunreaktion naiver und T-Gedächtniszellen. Normale Zellen tragen wenige MHC I Moleküle (etwa 100 pro Zelle), keine MHC II Moleküle und kostimulierenden Oberflächenproteine, so dass das Auftreten einer Autoimmunreaktion verhindert wird. Zur Aktivierung gegen Fremdproteine (Viren, Tumorzellen) müssen die T-Zellen durch zwei Signale aktiviert werden: 1. das spezifische Antigen im Kontext von MHC I oder II Molekülen; 2. kostimulierende Signale vermittelt über die Interaktion von CD 80 und CD 86 mit der B-7 Familie und aktivierende Zytokine (Coyle et al., 2001). Diese Funktionen werden hocheffektiv von dendritischen

Zellen übernommen. Sie nehmen Antigene in der Peripherie auf, prozessieren sie und präsentieren sie nach Migration in lymphatisches Gewebe dortigen T-Lymphozyten. Dendritische Zellen tragen auf ihrer Oberfläche eine große Zahl an MHC Molekülen, zusätzlich werden die nötigen kostimulatorischen Proteine exprimiert und Zytokine wie IL-12 sezerniert. Somit kann im lymphatischen Gewebe eine effektive Stimulation von Lymphozyten stattfinden, die nach Auswandern aus diesem Gewebe eine starke immunologische Reaktion in der Peripherie bewirkt.

Nach heutigen Erkenntnissen verläuft das Leben einer dendritischen Zelle in zwei Phasen: Die erste, unreife Phase der dendritischen Zelle findet in peripherem Gewebe statt. Die dort residenten DC`s sind hocheffiziente Antigen-aufnehmende Zellen. Dementsprechend befinden sie sich verstärkt in Geweben, die besonders mikrobieller Invasion ausgesetzt sind, so zum Beispiel in der Haut (mit insgesamt etwa 10^9 epidermalen Langerhans Zellen), dem Respirationstrakt und dem Gastrointestinaltrakt. Ihre Möglichkeiten zur Antigenaufnahme sind Phagozytose (Inaba et al., 1993; Moll et al., 1993; Reis e Sousa et al., 1993; Svensson et al., 1997), Makropinozytose (Sallusto et al., 1995) und rezeptorvermittelte Aufnahme, wie durch den Mannose-Rezeptor und $Fc\gamma$ -Rezeptor (Sallusto et al., 1995). Die rezeptorvermittelte Aufnahme ist besonders effektiv, da so Antigene, die in picomolaren und nanomolaren Konzentrationen vorliegen, aufgenommen werden können (Sallusto et al., 1994). Aufgenommene Antigene werden in den Endosomen prozessiert, in Peptidform an MHC II gebunden und danach zur Zelloberfläche transportiert und dort präsentiert (Sallusto et al., 1995; Winzler et al., 1997; Nijman et al., 1995; Pierre et al., 1997; Cella et al., 1997). Dendritische Zellen besitzen darüber hinaus die Fähigkeit exogen aufgenommene Antigene, z.B. aus nekrotischen Zellen, nicht nur auf MHC Klasse II Molekülen sondern auch auf MHC Klasse I zu exprimieren. Durch diese Eigenschaft können dendritische Zellen CD8-positive Zellen aktiviert werden (Crosspriming) und zu einer effektiven zytotoxischen Reaktion z.B. gegen virusinfizierte Zellen führen (Larsson et al., 2001, Heath et al., 2001). In der Phase der Antigenaufnahme ist die Kapazität der dendritischen Zellen zur Aktivierung von Lymphozyten gering, was auf die niedrige Expression von MHC II- und kostimulierenden Molekülen wie CD 80, CD 86 sowie LFA-3, ICAM-1 und der fehlenden Sekretion von Zytokinen zurückzuführen ist. Nach der Aktivierung der dendritischen Zellen z.B. durch bakterielle Antigene erfolgt die Ausreifung der Zellen in eine zweite Phase. Die dendritischen Zellen verlieren ihre Fähigkeit zur Antigenaufnahme, erhöhen im Gegenzug ihre Kapazität zur T-Zell-Stimulation durch Einbau der MHC II-reichen Endosomen in die Zellmembran und Expression von kostimulierenden Molekülen. Diese Signale an weitere Zellen des

Immunsystems bleiben mehrere Tage an der Zelloberfläche nachweisbar (Cella et al., 1997). Neben der Antigenaufnahme existieren weitere Faktoren, die zur Reifung von dendritischen Zellen führen. So wirken *in vitro* die Zugabe von Bakterien, des mikrobiellen Zellwandbestandteils LPS, CD 40-Ligand und Zytokine wie IL-1, GM-CSF und TNF- α stimulierend auf dendritische Zellen, wohingegen IL-10 diesem Vorgang entgegenwirkt (Buelens et al., 1997). Seit kurzem ist bekannt, dass gewisse GpC-Motive in DNA-Sequenzen, die vermehrt in Bakterien vorkommen, dendritische Zellen ausreifen lassen (Schattenberg et al., 2000; Sparwasser et al., 1998).

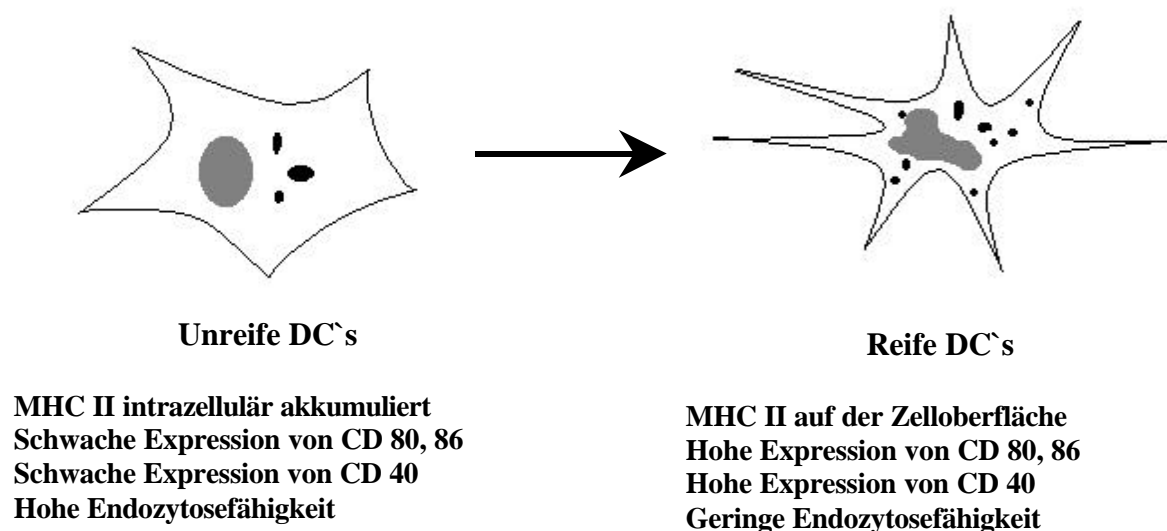


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Charakteristika bei Reifung der dendritischen Zellen. Reifung der DC's wird beispielsweise über LPS, TNF α oder CD 40-Ligand induziert. IL-10 inhibiert diesen Ausreifungsprozess.

In vivo wandern dendritische Zellen nach der Antigenaufnahme aus ihrem Ursprungsgewebe heraus in lymphoide Gewebe wie Lymphknoten und Milz. Dort findet die Interaktion mit weiteren Zellen des Immunsystems, wie B- und T-Zellen, statt. Bei dieser Migration wird die Ausreifung komplettiert. B- und T-Zellen werden durch sezernierte Chemokine angelockt; rezirkulierende T-Lymphozyten erhalten über diesen Mechanismus ihre Überlebensfähigkeit.

Die Richtung, in die dendritische Zellen wandern sollen, wird nach heutigen Erkenntnissen durch Chemokine vermittelt. Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind SLC (engl.: secondary lymphoid-tissue chemokine, sekundäres Chemokin lymphoiden Gewebes), das an den Rezeptor CCR7 von DC`s bindet und eine Wanderung in Richtung lymphoide Gewebe vermittelt, MIP 3 α (engl.: macrophage inflammatory protein, Makrophagen-Entzündungsprotein), das an den Rezeptor CCR6 von DC`s bindet und eine Wanderung in Richtung Haut vermittelt sowie RANTES, MIP 1 α und andere, die an den Rezeptor CCR1 von DC`s binden und eine Wanderung in Richtung Entzündung vermitteln (Mackay et al., 2000). Diese Chemokinrezeptoren befinden sich ebenfalls auf weiteren Zellen des Immunsystems, wie Lymphozyten, so dass über Chemokine eine Zusammenkunft verschiedener Zellpopulationen an demselben Ort vermittelt wird.

Die Effizienz dendritischer Zellen zur T-Zell-Stimulation wird unter anderem bei der sogenannten gemischten Leukozyten Reaktion (MLR, engl. mixed leukocyte reaction) deutlich. Dabei werden APC`s und T-Zellen verschiedenen MHC-Typs koinkubiert und die Proliferation der T-Lymphozyten gemessen. Normalerweise bedient man sich gleicher Zahlen von APC`s und T-Zellen; mit dendritischen Zellen als antigenpräsentierende Zellen lassen sich aber deutlich weniger APC`s einsetzen. Eine dendritische Zelle stimuliert anhaltsweise 100 bis 3.000 T-Zellen. Entsprechend effektiv ist die Stimulation via MHC II in bezug auf bestimmte Proteine und prozessierte Peptide, inklusive Bestandteile von Infektionserregern und Tumorantigene (Zitvogel et al., 1996; Paglia, 1996, Mayordomo et al., 1995; Hsu et al., 1996). In vivo formen dendritische Zellen sogenannte Cluster, in denen sie mit T-Zellen in Interaktion treten und ein Mikromilieu mittels wechselseitig sezernierter Zytokine und Chemokine bilden. Dendritische Zellen besitzen die Fähigkeit, die Immunreaktion in eine Th1- oder Th2-Reaktion zu lenken. Wird seitens der dendritischen Zellen IL-12 sezerniert, entwickeln sich CD4-positive T-Lymphozyten bevorzugt zu Th1 Zellen. Bei Fehlen von IL-12 oder wenigen kostimulierenden Molekülen (CD80, CD86, CD40) entstehen Th2 Zellen oder es wird eine Anergie oder Toleranz der T-Zellen induziert (Jonuleit 2001, Roncarlo 2001). Mittels CD 40 und einem neuen Rezeptor, genannt TRANCE/RANK, beides Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie, treten DC`s mit aktivierten und T-Gedächtniszellen in Kontakt, was zu einem verlängerten Überleben der dendritischen Zellen führt. Eine Aktivierung von CD 40 führt darüber hinaus zu einer Hochregulation von kostimulierenden Molekülen der dendritischen Zellen (Caux et al., 1994; Wong et al., 1997; Anderson et al., 1997).

Das Knochenmark stellt nach heutiger Auffassung das Hauptursprungsgewebe für dendritische Zellen dar. Daneben existieren weitere Gewebe, wie die Leber, die Milz und dem Thymus, die Vorläuferzellen von dendritischen Zellen enthalten. Dendritische Zellen können sich aus lymphoiden und myeloischen Vorläuferzellen entwickeln. Diese Unterscheidung zeigt sich in der Expression der Oberflächenmoleküle CD 11b und CD 8 α . Dabei spricht eine Population mit starker Expression von CD 11b und gleichzeitig niedriger Expression von CD 8 α für das Vorliegen von myeloischen DC's, wohingegen ein weitgehendes Fehlen von CD 11b bei positivem Test auf CD 8 α für lymphoide dendritische Zellen spricht (Ardavin et al., 1993; Wu et al., 1995; Wu et al., 1996). Neue Untersuchungen zeigen allerdings, dass CD 8 α auch auf reifen myeloischen dendritischen Zellen exprimiert werden kann (del Hoyo et al., 2002). Generell können unreife dendritische Zellen in periphere Gewebe einwandern und dort, gesteuert von lokalen Zytokinen und Chemokinen, in verschiedene Subpopulationen differenzieren, die sich in ihrer Expression verschiedener Oberflächenmarker widerspiegelt. Zu der Familie der dendritischen Zellen zählen die Langerhans Zellen der Haut, dendritische Zellen im Thymus, die mit für die Selektion von T-Lymphozyten verantwortlich sind, dendritische Zellen in der Leber und DC's in Milz und Lymphknoten, die man zusätzlich noch in folliculäre dendritische Zellen (FDC) und interdigitierende dendritische Zellen (IDC) unterteilt. FDC nehmen eine gewisse Sonderstellung unter den dendritischen Zellen ein, da sie nicht aus dem Knochenmark stammen (Matsumoto et al., 1997) und eine einzigartige Zusammensetzung ihrer Oberflächenmoleküle aufweisen, indem sie zum Beispiel sämtliche Rezeptoren für Komplement exprimieren (Liu et al., 1996, Liu et al., 1997). Gemäß ihrem Namen findet man FDC's vor allem in B-Zell-Arealen des Lymphfollikels. Dort präsentieren sie den B-Lymphozyten Immunkomplexe, die an den F_C-Rezeptoren der FDC's gebunden sind, was das Überleben dieser B-Lymphozyten gewährleistet und sie zur Differenzierung zu Plasmazellen und Antikörperproduktion anregt.

Wie in den vorangehenden Abschnitten beschrieben, ist die Aktivierung einer zellulären Immunantwort abhängig vom Reifungsstadium der dendritischen Zellen. Nicht aktivierte dendritische Zellen spielen eine bedeutende Rolle bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz gegen Autoantigene (Kurts et al., 1996, Forster et al., 1996). Der Triggerpunkt, ob eine Immunreaktion oder eine Toleranz erzeugt wird, ist abhängig von der Produktion proinflammatorischer Zytokine und der Anzahl kostimulierender Moleküle, wie CD 80 und CD 86 (Lu et al., 1997; Jonuleit et al., 2001). Dendritische Zellen sind somit von entscheidender Bedeutung für die Weichenstellung des Ablauf einer Immunreaktion. Diese Erkenntnisse eröffnen eine Reihe von neuen Ansätzen für die praktischen klinischen

Anwendung von dendritischen Zellen. Insbesondere T-Zell-modulierte pathologische Prozesse, wie Allergien, Autoimmunerkrankungen, Transplantationsreaktionen und Tumortherapie, sind ins Zentrum für Therapieansätze geraten. Bei einigen Autoimmunerkrankungen, wie der Psoriasis und der rheumatoiden Arthritis, ist eine direkte Involvierung von dendritischen Zellen beobachtet worden. Durch eine entsprechende Behandlung dendritischer Zellen, sei es mittels IL-10 oder der Transduktion mit Plasmiden, die für Th2 Zytokine kodieren, kann die Immunantwort so moduliert werden, dass eine T-Zell Suppression erzielt wird (Morita et al., 2001, Kim et al., 2001, Menges et al., 2002, Xiao et al., 2001, Prud'homme 2000).

Daneben existieren erste Ansätze zur Immuntherapie viraler Erkrankungen (Infektion mit Zytomegalievirus, Hepatitis C, humanen Immundefizienzvirus-1) bei immunsupprimierten Patienten mittels dendritischer Zellen, die mit viralen Antigenen gepulst sind (Geissler et al., 1997, Larsson et al., 2002, Ito et al., 2001, Cho et al., 2001). Dendritische Zellen wurden bereits erfolgreich in Phase I und II Studien bei Patienten mit metastasierten Karzinomen und Lymphomen beschrieben. Dabei werden autologe dendritische Zellen entweder mit einem tumorspezifischen Antigen, Tumorlysat, viralen Vektoren oder DNA, die die Information über das Protein enthalten, inkubiert und anschließend dem Patienten verabreicht. In einigen Fällen konnten mit dieser Methode komplette oder partielle Remissionen erzielt werden (Okada et al., 1998; Thurnher et al., 1997; Timmerman et al., 1998; Nestle et al., 1998; Schott et al., 2000).

Es existieren verschiedene Möglichkeiten und Protokolle, dendritische Zellen zu erhalten. Eine der ersten Methoden war die Dichtegradientenzentrifugation mit einer BSA-Konzentration von 1,06 g/ml in PBS oder kommerziell hergestellte Lösungen. Dabei werden einer Maus die Milz entnommen und sämtliche Splenozyten durch Ausspülen der Milzkapsel und anschließendem Kollagenaseverdau gewonnen. Nach der Trennung durch Zentrifugation lassen sich die Makrophagen durch einen Adhärenzschritt an Plastikschalen von den dendritischen Zellen trennen (McLellan et al., 1995). Alternativ können dendritische Zellen in größerer Menge aus murinen Knochenmarkszellen gezüchtet werden. CD 34-positive Vorläuferzellen im Knochenmark können aus dem Femur einer Maus gewonnen werden und durch eine einwöchige Inkubation mit GM-CSF und IL-4 zu reifen dendritischen Zellen selektiv herangezüchtet werden. Zur Anzucht dendritischer Zellen aus weiteren Ursprungsgeweben wie Thymus, Lymphknoten, Leber und Blut bedient man sich im wesentlichen einer der oben aufgeführten Methoden (Lu et al., 1994; Inaba et al. 1992a;

Vremec et al., 1997). Eine dritte Methode, dendritische Zellen zu züchten, ist die Generierung einer kontinuierlich proliferierenden Zelllinie. Dazu werden Splenozyten in einem durch Überstand einer Fibroblastenkultur konditionierten Medium unter Zugabe von Wachstumsfaktoren inkubiert. In der Suspension der Splenozyten befinden sich ebenfalls spezielle Vorläuferzellen, die gezielt zur Proliferation stimuliert werden. Durch kontinuierlichen Wechsel des Kulturmediums lässt sich die Vermehrung der dendritischen Zellen aufrecht erhalten. Diese Methode der Anzucht ist erstmals von Winzler et al. 1997 für dendritische Zellen aus der C57BL/6-Maus beschrieben und entwickelt worden.

Aufgrund der oben beschriebenen Befunde sind dendritischen Zellen sehr interessante Kandidaten für die Entwicklung eine Vakzine zur antigenspezifische Modulation der Autoimmunreaktion bei der NOD-Maus. Voraussetzung für diese Therapie ist die Bereitstellung einer homogenen Quelle von dendritischen Zellen, mit denen verschiedene Formen der Präaktivierung, der Antigenbeladung und der Zellapplikation getestet werden können. Es war deshalb von Interesse zu prüfen, ob es möglich ist, eine voll funktionsfähige DC-Zelllinie aus der NOD-Maus zu generieren, die als Adjuvants für Immunisierungstherapien eingesetzt werden könnte.

2. Material und Methoden

2.1 Reagenzien und Puffer

Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Ammoniumchlorid, NH ₄ Cl	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Aqua ad iniectabilia	Fresenius AG, Bad Homburg, Deutschland
BSA, Fraktion V	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Calcium Ionophore A23187	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Concavalin A	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
EDTA (Versen)	Seromed, Biochrom, Berlin, Deutschland
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Fa. Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
FITC-Dextran	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Formaldehyd	Fa. Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
GM-CSF	PharMingen, San Diego, CA, USA
Gold-Partikel, Ø 1 µm	Biorad, München, Deutschland
H ³ -Thymidin	Amersham,
Kaliumdihydrogenphosphat, KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
Latex Beads, FITC markiert, Ø 1,1 µm	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
LPS	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
mIL-1β Kit DuoSet	R&D Systems, Minneapolis, USA
mIL-12p70 Kit Quantikine	R&D Systems, Minneapolis, USA
mIL-6 Kit DuoSet	R&D Systems, Minneapolis, USA
mTNFα Kit DuoSet	R&D Systems, Minneapolis, USA
Murines IL-10	PharMingen, San Diego, CA, USA
Natrium-Azid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Natriumpyruvat	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Nutridoma-SP	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Saccharose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Verbrauchsmaterial

12 well Platten	Linbro, Flow Lab.,
15 ml Röhrchen	Corning Costar, Wiesbaden, Deutschland
2,5 ml Aufsätze f. Multipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
24 well plates, Pronectin F-coated	ICN, Eschwege, Deutschland
50 ml Röhrchen	Corning Costar, Wiesbaden, Deutschland
6 well Platten	Corning Costar, Wiesbaden, Deutschland
96 well Platten, Rundboden	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
96 well Platte Immuno; Maxisorp	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
FACS-Röhrchen	Falcon, Karlsruhe, Deutschland
Film, 36 Bilder	Kodak, Deutschland
Filtrierplatte Unifilter GF/C für Zellharvester	Packard, Dreieich, Deutschland
Kanüle, 25 G	Terumo, Leuven, Belgien
Petrischalen	Corning Costar, Wiesbaden, Deutschland
Pipettenspitzen; 0,1-10 µl, 1-100 µl, 100-1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serolog. Pipette 1 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serolog. Pipette 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serolog. Pipette 2 ml	Corning Costar, Wiesbaden, Deutschland
Serolog. Pipette 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serolog. Pipette 5 ml	Corning Costar, Wiesbaden, Deutschland
Spritze 10 ml; "Discardit"	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Medien und Pufferlösungen

DMEM	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Fetales Kälberserum	Seromed, Biochrom, Berlin, Deutschland
IMEM	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
MEM non-essential amino acid solution	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
PBS (ohne Ca ⁺⁺ und Mg ⁺⁺)	Gibco, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1645	Gibco, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Substrate Reagent (TMB)	R&D Systems, Minneapolis, USA

Geräte

Cellwasher „Harvester“	Packard, Dreieich, Deutschland
ELISA Software „easywin“	Tecan, Crailsheim, Deutschland
ELISA-Reader	Tecan, Crailsheim, Deutschland
FACS Software Lysis II	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACScan	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Inkubator Hera Cell	Heraeus, Hanau, Deutschland
Kamera, Vario-Orthomat 2	Leica, Bensheim, Deutschland
Maus-T-Lymphozyten - Anreicherungssäulen	R&D Systems, Minneapolis, USA
Mikroskop Fluovert	Leica, Bensheim, Deutschland
Multipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multipipette, 8-Kanal, 50 – 300 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetboy accu-jet	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipette 0,5 – 10 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette 10 – 100 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette 100 – 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Szintillationszähler	Packard, Dreieich, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau, Deutschland

Antikörper, Anti-Maus

<u>Antikörper</u>	<u>Markierung</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Isotyp</u>	<u>Klon</u>
CD 3	PE	PharMingen	rat IgG 2b, κ	17A2
CD 4	FITC	PharMingen	rat IgG 2a, κ	H129.19
CD 8a	PE	PharMingen	rat IgG 2a, κ	53-6.7
CD 11b	PE	PharMingen	rat IgG 2b, κ	M1/70
CD 11c	FITC	PharMingen	Armen. Hamster IgG 1	HL3
CD 14	FITC	PharMingen	rat IgG 1, κ	rmC5-3
CD 16/32	unmarkiert	PharMingen	rat IgG 2b, κ	2.4G2
CD 19	FITC	PharMingen	rat IgG 2a, κ	1D3
CD 34	unmarkiert	PharMingen	rat IgG 2a, κ	RAM34
CD 40	unmarkiert	PharMingen	rat IgG 2a, κ	3/23
CD 80	FITC	PharMingen	Armen. Hamster IgG 2, κ	16-10A1
CD 86	FITC	PharMingen	rat IgG 2a, κ	GL1

I-A ^k	FITC	PharMingen	mouse IgG 2a	10-3.6
Isotyp	unmarkiert	PharMingen	rat IgG 1, κ	R3-34
Isotyp	FITC	PharMingen	Armen. Hamster IgG 2, κ	Ha4/8
Isotyp	unmarkiert	PharMingen	rat IgG 2b, kappa	A95-1
Isotyp	FITC	PharMingen	rat IgG 2a, kappa	H129.19
Isotyp	PE	PharMingen	Armen. Hamster IgG 1	G235-2356
rat anti-mouse dendritic / interdigitating cells	unmarkiert	serotec	rat IgG 2	MIDC-8
Anti-rat IgG 1/2b	FITC	PharMingen	mouse IgG 2a	G28-5
F 4/80	unmarkiert	BMA	rat IgG 2	CI:A3-1
NLDC 145, anti mouse dendritic cells (DEC-205)	unmarkiert	BMA	rat IgG 2b	NLDC 145
Anti IL-4	unmarkiert	PharMingen	Rat IgG 1	11B11
Anti IFN γ	unmarkiert	PharMingen	Rat IgG 1	XMG1.2

Hersteller der Antikörper:

- PharMingen, San Diego, CA, USA
- BMA Biomedicals, Augst, Schweiz
- serotec, Raleigh, NC, USA

Fluorospheres zur Qualitätskontrolle des Durchflußzytometers:

- DakoBeads, Dako, Wiesentheid, Deutschland

Die Mäuse der Linien NOD und C57BL/6 entstammen dem Tierstall des DDFI.

Die Fibroblastenlinie NIH/3T3 wurde von der ATCC erhalten.

2.2 Methoden

2.2.1 Kulturmedium

Zur Herstellung einer dendritischen Zelllinie aus der non-obese diabetic (NOD) Maus wurde IMDM-Medium mit 30% Zellkulturüberstand der NIH/3T3-Fibroblastenkultur, 10% hitzeinaktiviertem FKS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 50 µM β-Mercaptoethanol und 10 ng rekombinantes murines GM-CSF pro ml verwendet. Hitzeinaktiviertes FKS wurde durch Erhitzen im Wasserbad auf 56°C für 30 Minuten hergestellt. Das Kulturmedium wurde vor der Verwendung frisch zusammengesetzt, um gleichbleibende Bedingungen für die dendritischen Zellen zu gewährleisten.

Für die Kultur der dendritischen Zellen aus Knochenmark wurde das Medium RPMI 1640 verwendet, das mit 10 % hitzeinaktiviertem FKS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin sowie 50 µM β-Mercaptoethanol versetzt war. Dieses Medium wird im folgenden als RPMI+ bezeichnet. Alle Zellen wurden im Brutschrank bei 37° Celsius, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert.

2.2.2 Fibroblastenkultur

Zur Kultivierung der Fibroblasten der Linie NIH/3T3 wurde DMEM mit 10% hitzeinaktiviertem FKS und 100 U/ml Penicillin und 100 µg Streptomycin benutzt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37° C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ herangezüchtet. Da durch kontinuierliche Proliferation der Fibroblasten der Boden der Zellkulturflaschen nach etwa 4 Tagen über das Stadium eines Monolayers hinaus bedeckt war, mussten die Zellen alle vier Tage auf neue Platten verteilt werden. Der Zellkulturüberstand wurde jeweils abgenommen, steril filtriert und bei -20° C gelagert.

2.2.3 Generation der Zelllinie dendritischer Zellen

Die dendritischen Zellen wurden wie von C. Winzler et. al. (1997) beschrieben angezüchtet. Der Vorgang wird im folgenden beschrieben.

Einer 6 Wochen alten NOD-Maus wurde unter sterilen Kautelen die Milz entnommen und in ein 50 ml Röhrchen mit 10 ml eisgekühltem PBS gegeben. Bis zur Weiterverarbeitung wurde sie auf Eis belassen. Alle weiteren Prozeduren wurden unter einer Sterilbank sowie mit sterilen Einwegmaterialien beziehungsweise autoklavierten Mehrwegmaterialien durchgeführt. Zunächst wurde die Milz mit einer Pinzette in eine Petrischale gelegt und mit einer feinen Schere von anhängendem Fett- und Bindegewebe befreit. Anschließend wurde eine mit einer 26G-Kanüle versehene 10 ml Spritze mit IMDM-Medium gefüllt. Die Milz wurde mit der Pinzette gehalten und die Milzkapsel mit der gefüllten Spritze punktiert, so dass das Medium injiziert und die Kapsel auf diese Weise ausgespült werden konnte. Die so gewonnene Zellsuspension wurde in der Petrischale aufgefangen. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde die Milz anschließend mit dem Stempel der Spritze durch ein steriles Sieb gerieben; das Sieb wurde schließlich mit einigen Millilitern frischen IMDM-Mediums gespült.

Diese Zellsuspension wurde mit $250 \times g$ für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgossen und verworfen, das Pellet in frischem RPMI-Medium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das neue Pellet wurde nach Dekantieren in Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert. Die eingesetzte Menge des Puffers richtete sich nach dem abgeschätzten Volumen des Pellets, wobei das zehnfache Volumen an Erythrozyten-Lyse-Puffer eingesetzt wurde. Durch anschließendes Auf- und Abpipettieren mit einer 1000 μ l-Pipette erhielt man eine Einzelzellsuspension. Diese wurde fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Hyperosmolarität des Lyse-Puffers kann die Membran der Erythrozyten nicht standhalten, so dass sie ihre Integrität verliert und zerreißt. Im Anschluss wurde erneut mit $250 \times g$ für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Der dekantierte Überstand war durch das freigewordene Hämoglobin rot gefärbt. Ein Waschschrift in PBS schloss sich an. Die Erythrozytenfraktion war nach diesem Vorgang makroskopisch nicht mehr zu erkennen, d.h. das Pellet war weißlich.

Dieses Pellet wurde in Kulturmedium, das zuvor auf $37^\circ C$ angewärmt worden war, resuspendiert und die erzeugte Zellsuspension gezählt. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen / ml in eine 12-well-Platte ausgesät, wobei in jede Vertiefung 2 ml der Zellsuspension gegeben wurden. Die Kulturplatte wurde im Brutschrank bei $37^\circ C$, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2 herangezüchtet. Alle drei bis vier Tage wurden 80% des in den Vertiefungen befindlichen Kulturmediums abgesogen und verworfen, was im Anschluss durch das entsprechende Volumen an frischem Kulturmedium ersetzt wurde. Dieser Vorgang war nötig, da nach dieser Zeit die Nährstoffe des

Kulturmediums zu einem größeren Teil verbraucht waren und der pH-Wert der Zellsuspension nicht mehr im Optimalbereich lag, was sich an einer Farbveränderung des pH-Indikators Phenolrot zeigte, der sich in dem Kulturmedium befand. Waren die Zellen zu einer Dichte von mehr als 80% herangewachsen, erfolgte ein Ablösen durch Inkubation in einer PBS/EDTA-Lösung für 10 min. Durch Auf- und Abpipettieren lösten sich mehr als 90% der Zellen, die anschließend auf drei neue Platten in IMDM Medium mit GM-CSF ausgesät wurden. Fest adhärente Zellen wurden belassen und verworfen. Durch kontinuierliche Passagen in RPMI mit GM-CSF konnte nach 12 Wochen eine stabile, langsam proliferierende Zellpopulation gewonnen werden, die alle zwei Wochen auf neue Platten ausgesät wurde. Diese Zellen werden als NOD-DC-1 Zellen bezeichnet.

Die Zellvitalität wurde in den verschiedenen Experimenten durch Anfärben mit einer Trypanblau-Lösung (Endkonzentration: 1:10) und Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Trypanblau färbt abgestorbene Zellen bläulich, da die erhöhte Permeabilität der Zellmembran toter Zellen das Eindringen des Farbstoffes in die Zelle ermöglicht. Beim Ernten von unbehandelten Zellkulturplatten war die Vitalität immer größer als 95%.

2.2.4 Präparation von dendritischen Zellen aus Knochenmark

Die Präparation richtete sich nach dem Protokoll von Inaba et. al., 1992a. Zur Anzucht dendritischer Zellen aus murinem Knochenmark wurden NOD-Mäuse unter Nembutalnarkose mittels Dekapitation getötet. Unmittelbar im Anschluss wurden den Mäusen unter sterilen Bedingungen jeweils beide Femura und Tibiae entnommen. Nach Entfernung sämtlichen Muskel- und Bindegewebes wurden sie durch einminütiges Waschen in 70 %igem Ethanol gereinigt und anschließend in PBS gewaschen. In RPMI 1640 wurden die Kondylen von den Diaphysen mit einer sterilen Schere getrennt. Mittels einer 25G-Kanüle und einer 10 ml Spritze wurde das Knochenmark mit RPMI 1640 aus den Diaphysenschäften und Kondylen gespült. Das ausgelöste Knochenmarkgewebe musste durch Auf- und Abpipettieren suspendiert werden. Die erhaltene Zellsuspension wurde anschließend bei $250 \times g$ zentrifugiert und in Erythrozytenlysepuffer resuspendiert. Um sämtliche Erythrozyten zu entfernen, wurde die Suspension 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und das verbleibende Pellet in RPMI+ aufgenommen und gezählt. Im Durchschnitt wurden auf diese Weise ca. 30×10^6 Knochenmarkszellen isoliert. In einer Konzentration von 2×10^6 Zellen pro Milliliter

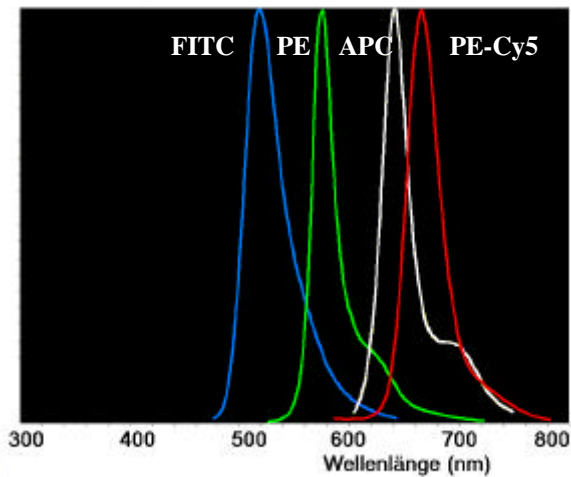
wurden die Zellen in einer 6-well Platte mit 4 Milliliter pro Vertiefung ausgesät. Um die Differenzierung zu dendritischen Zellen zu fördern, wurden 5 ng GM-CSF / ml hinzugegeben. Im Anschluss kam die Platte in einen Brutschrank mit 37° C, 95 % relativer Feuchtigkeit und 5 % CO₂.

Die Pflege der Zellkultur lief nach einem festen Zeitplan ab, wonach an Tag 1, 3 und 5 nach Präparation der Knochenmarkszellen 75 % des Mediums nach Schwenken der Platte entnommen und verworfen und durch gleiches Volumen frischen Mediums ersetzt wurde. Es wurden erneut 5 ng GM-CSF / ml und ab Tag 1 IL-4 in einer Konzentration von 50 U / ml zugesetzt. An Tag 5 wurde zur Ausreifung der dendritischen Zellen 1000 U TNF α / ml zugefügt. An Tag 7 konnten Experimente mit den dendritischen Zellen unternommen werden. Im folgenden werden diese Zellen als BMDC (bone marrow derived dendritic cells) bezeichnet.

2.2.5 Charakterisierung der dendritischen Zellen

2.2.5.1 Durchflusszytometrische Analysen der Oberflächenmarker

Die dendritischen Zellen wurden mit Hilfe von monoklonalen, fluorochromkonjugierten Antikörpern in einem Durchflußzytometer (FACS[®] Gerät) charakterisiert. In der Regel wurden Zweifarbanalysen durchgeführt, wobei zum einen der FITC-Kanal und zum anderen der PE-Kanal des Durchflußzytometers aktiviert waren. Diese Kanäle sind optimal zur Absorption des vom entsprechend markierten Antikörper emittierten Lichtspektrums geeicht. Eine Kompensation, um ein individuelles Überlappen der Absorptionsspektren der Fluorochrome auszugleichen, wurde anhand von markierten Zellen durchgeführt. Die zeitlich gleichbleibende Qualität der Detektion des emittierten Lichts wurde mit Hilfe von fluorochrommarkierten Beads zu Beginn jeder Analyse sichergestellt und dokumentiert.



Fluorochrom	Emission ¹⁾	Molekulargewicht
FITC	519 nm	389 Da
PE	578 nm	240.000 Da
APC	660 nm	104.000 Da
PE-Cy5	670 nm	250.000 Da

¹⁾ bei Anregung mit einem 488 nm Argon-Laser

Abbildung 2.1: Emissionsspektren gebräuchlicher Fluorochrome

Die Markierung erfolgte entweder direkt mit FITC- oder PE-konjugierten monoklonalen Antikörpern oder mit unmarkierten monoklonalen Antikörpern, die im zweiten Schritt mit einem FITC- oder PE-markierten Sekundärantikörper detektiert wurden, dessen Zielantigen der speziesspezifische Isotyp des unmarkierten Antikörpers ist.

Die FACS-Analyse der dendritischen Zellen begann nach dem Ablösen der Zellen von der Kulturplatte durch Inkubation in 5 ml PBS und 10% Ethylendiamintetraazetat (EDTA). EDTA ist ein Komplexbildner, der freie zweiwertige Ionen (Ca^{2+} , Mg^{2+}) in der Lösung zu binden vermag. Kalzium ist ein notwendiger Bestandteil für die Adhärenz der Zellen an die Zellkulturplatte und die Ausbildung von Zellhaufen. Nach der Herstellung einer Einzelzellsuspension erfolgte eine Inkubation in 10 % gepooltem Mausserum. Das Serum wurde durch einminütige Zentrifugation mit $13.000 \times g$ aus dem Blut von NOD-Mäusen gewonnen. Verwendet wurde eine Mischung zu gleichen Anteilen aus 8 verschiedenen Mäuseseren. Die Inkubation erfolgte 15 Minuten auf Eis. Dadurch wurde eine ausreichende Blockierung der F_c -Rezeptoren der dendritischen Zellen erreicht. Der Vorgang setzte sich mit einem weiteren Waschschrift fort. Anschließend wurden die Zellen in 0,5 ml PBS resuspendiert und durch Zugabe von $0,1 \mu\text{g}$ Antikörper pro 1×10^6 Zellen markiert. Die Färbung wurde in 1 ml PBS für 30 Minuten auf Eis durchgeführt. Nach zwei weiteren Waschvorgängen wurden die Zellen in 0,5 bis 1 ml reinem PBS aufgenommen und im Durchflußzytometer analysiert. Für sämtliche Wasch- und Färbeschritte wurde eiskaltes PBS mit 5 % hitzeinaktiviertem FKS benutzt.

Da monoklonale Antikörper nicht nur spezifisch an ihrem Zielantigen, sondern auch unspezifisch an weiteren Strukturen der Zelloberfläche, wie zum Beispiel an noch freien F_C-Rezeptoren, gebunden sein können, wurde zur klaren Abgrenzung der spezifischen Bindung zur unspezifischen eine Färbung der Zellen mit einem Antikörper vom gleichen Isotyp durchgeführt. Bei diesen Isotypkontrollen ist die Spezies des Ursprungs ebenfalls gleich; das Zielantigen wird dabei entweder vom Hersteller als unbekannt angegeben oder der Antikörper richtet sich gegen ein irrelevantes, das heißt auf Zelloberflächen nicht vorkommendes Antigen. Auf jeden Fall ist sichergestellt, dass sich das Zielantigen nicht auf der Zelloberfläche der zu untersuchenden Zellpopulation befindet. In der Darstellung der Ergebnisse der FACS[®]-Analysen wurde die Kurve der Isotypkontrolle unmittelbar an die y-Achse gelegt, um einen optimalen Vergleich von unspezifischer zu spezifischer Bindung zu gewährleisten. Als Antikörper wurden verwendet: CD 11c (Klon HL3), Klon NLDC 145 und Klon MIDC-8 als Nachweis DC-spezifischer Marker sowie CD 11b (Klon M1/70), CD 40 (Klon 3/23), CD 80 (Klon 16-10A1), CD 86 (Klon GL1), I-A^k (Klon 10-3.6) zur genaueren Differenzierung der dendritischen Zellen; CD 3 (Klon 17A2), CD 4 (Klon H129.19) und CD 8a (Klon 53-6.7) zum Nachweis von T-Zellen; CD 14 (Klon rmC5-3) und F 4/80 (Klon CI:A3-1) als spezifische Marker für Makrophagen; CD 19 (Klon 1D3) zum Nachweis von B-Zellen, sowie CD 34 (Klon RAM34) als Marker für medulläre Vorläuferzellen. Zum Nachweis von F_C-Rezeptoren wurde der Antikörper CD 16/32 (Klon 2.4G2) verwendet.

Tabelle 2.1: Verwendete Antikörper und Charakteristika der entsprechenden Antigene

<i>Antigen</i>	<i>Funktion</i>	<i>Vorkommen</i>
CD 4	Teil des T-Zell-Rezeptors	T-Lymphozyten
CD 8a	Teil des T-Zell-Rezeptors	T-Lymphozyten
CD 11b	Adhäsionsmolekül; bildet mit CD 18 Mac-1 (CR3)	MΦ, DC, T-Lymphozyten, Granulozyten
CD 11c	Extrazelluläre Adhäsion; bildet mit CD 18 CR4	DC, NK, T-Lymphozyten, MΦ
CD 14	Antigen der myeloischen Differenzierung	Makrophagen, Granulozyten
CD 16/32	F _C γ III- und F _C γ II-Rezeptor	NK, Monozyten, MΦ, DC, Granulozyten, B-Zellen
CD 19	Co-Rezeptor des B-Zellrezeptors	B-Lymphozyten
CD 34	Ligand für L-Selectin	Unreife Knochenmarkszellen
CD 40	APC – T-Zell-Interaktion, T-Zell-/B-Zell-Kostimulation	DC, T- und B-Zelluntergruppe
CD 80	T-Zell - B-Zell-Interaktion,	DC, MΦ
CD 86	T-Zell - B-Zell-Interaktion,	DC, MΦ, B- und T-Zellen
DEC-205	205 kDa – Membranprotein, Funktion unbekannt	Dendritische Zellen
F4/80	Funktion unbekannt	Makrophagen
I-A ^k	MHC II-Molekül, Antigenpräsentation	MΦ, DC
MIDC-8	Intrazelluläres Protein, Funktion unbekannt	Dendritische Zellen

DC: Dendritische Zellen, NK: natürliche Killerzellen, MΦ: Makrophagen

Die durchflußzytometrische Messung wurde mit dem Software-Programm „Lysis II“ überwacht, die Auswertung erfolgte mit dem Programm „WinMDI[®]“, Version 2.8., entwickelt von J. Trotter, Scripps Research Institute, USA.

Bei jeder Messung wurden mindestens 10.000 Zellen analysiert.

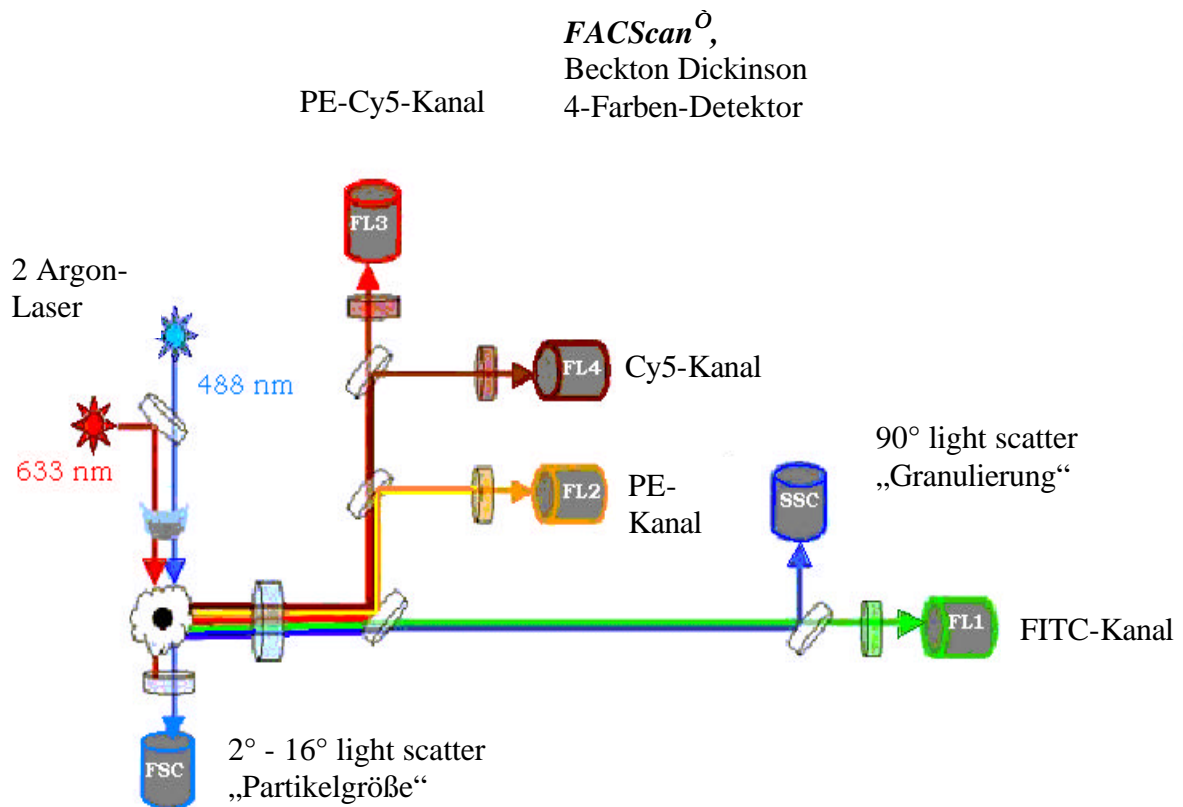


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Durchflusszytometers am Beispiel des Modells FACScan[®] der Firma Beckton Dickinson;
FL1 – 4 stellen die Detektoren der verschiedenen Fluoreszenzspektren dar;
FSC (forward scatter) und SSC (side scatter), benannt nach der Streurichtung des empfangenen Lichtsignals, messen Partikelgröße und deren Granulierung.
Die Kanäle FL3 und FL4 sind im Rahmen dieser Arbeit nicht benutzt worden.

2.2.5.2 Analyse des Phänotyps der dendritischen Zellen nach der Zellaktivierung

Zur weiteren Analyse wurden die dendritischen Zellen mit verschiedenen Stimulanzen behandelt. Bei einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen / 2ml wurden Zellen mit LPS (1000 ng/ml), anti-CD 40 Antikörper (1 μ g/ml), IL-10 (10 ng/ml) oder TNF α (1000 U/ml) für 24 Std. inkubiert. Anschließend erfolgte eine Analyse der Oberflächenmarker CD 11c, CD 40, CD 80, CD 86 und I-A^k.

Es befanden sich bei keiner Betrachtung mehr als ca. 5 % abgestorbene Zellen in der Suspension.

2.2.5.3 Detektion von intrazytoplasmatischen Antigenen

Zur Charakterisierung von Zellpopulationen ist es von Interesse, spezifische antigene Strukturen auch im Zellinneren zu detektieren. Man bedient sich dazu einer Methode, wie sie von Jung et al. 1993 beschrieben wurde. Darauf aufbauend wurde in dieser Arbeit ein Kit der Firma PharMingen benutzt. Der Präparationsablauf wird im folgenden kurz beschrieben.

Insgesamt $0,5$ bis 1×10^6 dendritische Zellen wurden nach ersten Waschschritten mit PBS in $100 \mu\text{l}$ PBS aufgenommen und mit $0,25 \mu\text{g}$ eines oberflächenspezifischen Antikörpers, vor allem CD11b, CD11c und CD3, für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in $250 \mu\text{l}$ einer Formaldehydlösung fixiert und 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschrift erfolgte die Permeabilisierung der Zellen durch Inkubation mit $500 \mu\text{l}$ einer 1%igen saponinhaltigen Lösung für 20 min. Alle weiteren Waschschriffe wurden nun mit dieser Saponinlösung durchgeführt. Die Inkubation zur Permeabilisierung dauerte 20 Minuten. Anschließend wurden die Zellen in $100 \mu\text{l}$ Saponinlösung aufgenommen und mit $0,5 \mu\text{g}$ des Antikörpers gegen das intrazelluläre Antigen für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Hier wurde der DC-spezifische Antikörper MIDC-8 eingesetzt. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Zellen in $50 \mu\text{l}$ einer 0,5 % igen Formaldehydlösung zur durchflußzytometrischen Analyse aufgenommen.

2.2.5.4 Analyse der funktionellen Aktivität der dendritischen Zellen

2.2.5.4.1 Bestimmung der Pinozytose und Phagozytoseaktivität

Die Fähigkeit der Antigenaufnahme wurde durch zwei Versuche untersucht, in denen die Aufnahme von löslichen Molekülen durch Pinozytose und von Partikeln durch Phagozytose getestet wurden.

Für beide Experimente wurden $0,5 - 1 \times 10^5$ NOD-DC1 Zellen auf 24-well Platten ausgesät. In dem Pinozytoseversuch wurde nach 48 Std. $200 \mu\text{g/ml}$ mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC (Fluorisothiocyanat) markiertes bovines Albumin hinzugeben (Sigma). Es folgte eine Inkubation für 5, 10, 20, 30 und 60 min bei 37°C oder 4°C . Anschließend wurden die Zellen geerntet, mit eisgekühltem PBS gewaschen und mit einem PE-markierten anti-CD 11c Antikörper markiert. Ausgewertet wurden die Zahl der doppelt-positiven Zellen im Durchflußzytometer.

Die Phagozytoseeigenschaft der dendritischen Zellen wurde mit Hilfe von Goldpartikeln, die einen Durchmesser von 1 μm besaßen, dargestellt. Dazu wurden 40 und 80 μg der Goldpartikel in eine Vertiefung mit NOD-DC-1 Zellen oder BMDC der 12-well Platte gegeben und durch Schwenken der Platte vermischt, so dass eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Partikel erreicht wurde. Unter dem Mikroskop wurde eine homogene Ausbreitung der Partikel kontrolliert. Anschließend wurden die Zellen wieder bei 37° C, 95 % relativer Feuchtigkeit und 5 % CO_2 inkubiert. Das Fortschreiten der Phagozytose wurde nach Zugabe der Partikel jeweils nach 15, 30, 45, 60, 120 und 180 Minuten unter dem Mikroskop verfolgt. Dazu wurden 100fache und 320fache Vergrößerungen verwendet. Es ist besonders wichtig, dass die Zellen sich zwischen den Betrachtungen unter dem Mikroskop wieder im Inkubator befinden, da die Phagozytose unter Raumluftbedingungen erheblich langsamer verläuft. Mit der angeschlossenen Fotokamera wurden nach obigen Zeitabständen Fotos zur Dokumentation erstellt.

Bei der zweiten Methode wurden FITC-markierte Latex-Beads (1,1 μm , 1×10^7 pro well) (Sigma) für 10, 20, 30 und 60 min bei 37°C oder bei 4°C zu den Zellen gegeben. Am Ende der Inkubation wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen, mit einem PE-markierten anti-CD11b Antikörper markiert und wie für den Pinozytoseversuch beschrieben im Durchflusszytometer analysiert.

2.2.5.4.2 Analyse der Zytokinproduktion

Zur Detektion von Zytokinen, die von den dendritischen Zellen produziert werden, wurde die Methode des enzymgekoppelten Immunosorbent Assay benutzt.

Gemessen wurden die Zytokine im Mediumüberstand nach der Stimulation von 2×10^5 NOD-DC1 Zellen (in 1 ml Medium auf einer 24-well Platte) für 24 h, 3 und 7 Tage, wobei die Zellen am Tag 3 mit neuem Medium gefüttert wurden (inklusive Stimulanz) und jeweils 24 Std. vor der Mediumabnahme neues Medium (inklusive Stimulanz) zugegeben wurde. Gemessen wurde somit jeweils die akkumulierte Zytokinfreisetzung über 24 h. Bis zur Testung wurden die Mediumüberstände bei -80° Celsius eingefroren. Insbesondere wurde darauf geachtet, dass möglichst wenige Auftau- und Einfriervorgänge durchgeführt wurden, um eine Degradation der untersuchten Zytokine zu vermeiden.

Mit folgenden Reagenzien wurde stimuliert:

- LPS mit 1000; 100; 10; 1; 0,1; 0,01 ng/ml
- TNF α mit 1000; 750; 500; 250; 100 U/ml
- Anti-CD 40 mit 0,25 μ g/ml
- IL-10 mit 40; 20; 10; 5; 2,5 ng/ml

Folgende Zytokine wurden analysiert:

- IL-1 β
- IL-6
- TNF α

Es wurden ELISA-Kits der Firma R&D benutzt. Die Technik und Versuchsablauf eines werden im Folgenden beschrieben.

Eine Multiwell ELISA Platte mit 96 Vertiefungen (Nunc Maxisorb) wird mit der erforderlichen, vom Hersteller angegebenen Menge an sogenanntem Capture-Antikörper beschichtet, das heißt, in jede Vertiefung wurden 100 μ l der Antikörperlösung gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser erste Antikörper lagert sich an die Wand der Vertiefung und dient dazu, die im Zellkulturüberstand befindlichen Zytokine spezifisch zu binden. Die Multiwellplatte zeichnete sich nach Angaben des Herstellers Nunc durch eine hohe Bindungskapazität für Antikörper aus. Nach der Inkubationszeit wurde die Multiwellplatte gewaschen. Dazu wurden 300 μ l PBS mit 0,05 % Tween 20 bei einem pH von 7,4 pro Vertiefung gegeben und anschließend wieder entfernt. Insgesamt waren drei Waschschritte erforderlich, wobei nach dem dritten Waschschritt die Flüssigkeit durch Klopfen gegen Zellstoff besonders gründlich entfernt wurde. Im folgenden werden diese drei Waschschritte zusammenfassend nur noch als Waschvorgang bezeichnet.

Nach Entfernen der Antikörperlösung wurden in die Vertiefungen 300 μ l einer 1 % igen BSA-Lösung gegeben. Sie bewirkt eine Blockierung freier, unspezifischer Bindungsstellen.

Im Anschluss an einen Waschvorgang erfolgte die Zugabe von jeweils 100 μ l Zellkulturüberstand. Parallel musste zur Ermittlung einer Standardkurve eine vom Hersteller mitgelieferte und definierte Menge an dem zu untersuchenden Zytokin in einer exponentiell aufsteigenden Konzentration in die Vertiefungen gegeben werden. Ebenso musste zu demselben Zweck ein Leerwert auf der Platte vorhanden sein. Sämtliche Proben wurden als Doppelansatz messtechnisch untersucht. Die Ergebnisse sind Grundlage für die Ermittlung von Mittelwerten.

Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden wurde die Platte einem weiteren Waschvorgang unterzogen. Nun wurden 100 μ l einer Biotin-gekoppelten Detektions-Antikörperlösung in die

Vertiefungen für 2 Std. gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl Meerretichperoxidase (HRPO)-konjugiertem Streptavidin für 20 min, welches eine starke Bindung mit Biotin eingeht. Nach einem Waschvorgang wurde die Substratlösung bestehend aus gleichen Teilen aus Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) hinzugegeben und für weitere 20 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Redoxreaktionen von Wasserstoffperoxid mit Tetramethylbenzidin, die durch die HRPO katalysiert werden, färbt sich Tetramethylbenzidin bläulich; nach anschließender Zugabe von 1 N Schwefelsäure (H₂SO₄) kommt es zu einem Farbumschlag; die Lösung erscheint nun gelblich. Die Intensität der Farbe ist dabei von der Konzentration des zugegebenen Zytokins beziehungsweise der Konzentration des im Kulturüberstand befindlichen Zytokins abhängig.

Die Multiwellplatte wurde nun im Spectrophotometer der Firma Tecan, Crailsheim, Deutschland, analysiert. Der optische Filter war auf eine dem Farbstoff entsprechende Wellenlänge von 450 nm geeicht, ein zweiter Filter für eine Wellenlänge von 620 nm wurde als Korrektionsfilter gewählt.

Die Detektionsbereiche der IL-1β, IL-6 und TNFα ELISAs lagen jeweils zwischen 15,6 und 1000 pg/ml.

2.2.5.4.3 Stimulation allogener T-Lymphozyten in einer gemischten Leukozytenreaktion (MLR)

Um die Fähigkeit der NOD-DC1 Zellen zu testen, allogene T-Lymphozyten zu stimulieren, wurden isolierte T-Lymphozyten von C57BL/6-Mäusen zusammen mit den DC's inkubiert. Als Stimulatorzellen dienten die dendritischen Zellen der Langzeitkultur, die mit 3000 rad bestrahlt wurden und zu 2.000, 4.000, 20.000 und 40.000 Zellen pro Vertiefung einer 96-Well Rundboden-Mikrotiterplatte (Corning) eingesetzt wurden. Als Negativkontrolle dienten Ansätze ohne Zugabe von dendritischen Zellen.

Für die Isolierung von allogenen T-Lymphozyten wurde eine Aufreinigung mit Maus CD 3+ Anreicherungssäulen der Firma R&D durchgeführt. Zunächst wurden Splenozyten wie unter Punkt 2.2.3. beschrieben isoliert. Nach einem Waschschritt wurden die Splenozyten in speziellem Isolierungspuffer, der dem Kit beilag, aufgenommen und gezählt. Die Isolierung der T-Lymphozyten erfolgte mit Hilfe von Säulen, die mit antikörperbeschichteten Glaspartikeln beladen sind. Das Prinzip der Isolierung beruht auf negativer Selektion der Zellen (Wigzell, H., 1976). Hierbei werden die B-Lymphozyten durch die Interaktion mit

anti-Immunglobulin-Antikörper gebunden und die Monozyten durch Bindung ihrer F_C-Rezeptoren an weitere, immunglobulinbeschichtete Glaspartikel entfernt.

Nachdem eine Konzentration von 50×10^6 Zellen pro Milliliter eingestellt worden war, wurde ein Milliliter der Zellsuspension in die Glassäule eingelassen und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Isolierungspuffer eluiert, bei $250 \times g$ für 10 Minuten zentrifugiert und in RPMI+ resuspendiert. Die eluierte Zellsuspension ist hoch angereichert mit T-Lymphozyten und konnte nun für weitere Experimente verwendet werden.

Die frisch isolierten T-Lymphozyten wurden in einer konstanten Konzentration von 2×10^5 Zellen pro Vertiefung zu den vorgelegten NOD-DC1 Zellen pipettiert. Das Endvolumen pro Vertiefung betrug jeweils 200 μ l. So wurden DC / T-Zell-Relationen von 0, 0,01, 0,02, 0,1 und 0,2 eingestellt. Nach einer dreitägigen Inkubationsphase bei 37° C, 95 % relativer Feuchtigkeit und 5 % CO₂ im Brutschrank wurde jedem Ansatz radioaktives [³H]-Thymidin in einer Aktivität von 1 μ Ci pro well zugesetzt. Dies wurde unter Einhaltung der gängigen Strahlenschutzmaßnahmen durchgeführt. Nach 18 Std. wurden die Zellen in einem Zellharvester auf eine Filterplatte überführt, wobei von den Zellen nicht inkorporiertes radioaktives [³H]-Thymidin ausgewaschen wurde. Die Filterplatte konnte nach Zugabe von je 20 μ l Szintillatorflüssigkeit im Szintillationszähler analysiert werden. Dabei wurde jeweils der Mittelwert aus Doppelansätzen bestimmt.

2.2.5.4.4 Messung der Zytokinproduktion der T-Zellen nach MLR

Da T-Lymphozyten nach Stimulation durch Antigen präsentierende Zellen Zytokine produzieren, wurden wie oben beschrieben gemischte Leukozytenreaktionen durchgeführt und anschließend die produzierten Zytokine in den T-Lymphozyten mittels intrazytoplasmatischem FACS analysiert. Für die Durchführung wurden hier allerdings folgende Modifikationen vorgenommen:

- 1) Es wurden 1×10^6 T-Lymphozyten mit 1×10^5 dendritischen Zellen inkubiert, wobei sowohl die NOD-DC1 Zelllinie als auch BMDC zweier NOD-Mäuse eingesetzt wurden.
- 2) Die Zellen wurden mit einem Volumen von 1 ml pro Vertiefung in 24-well Platten ausgesät und für 3 Tage inkubiert.

- 3) Die eingesetzten FITC-markierten Antikörper waren gegen die Zytokine IL-4 und IFN γ gerichtet; der eingesetzte PE-markierte Oberflächenantikörper war gegen CD 3 gerichtet.
- 4) Die Zellen wurden 18 Stunden vor dem Ernten mit 10 ng Phorbolmyristat (PMA) / ml und 1 μ M Ionomycin stimuliert und 8 Stunden vor Analyse mit Brefeldin A versetzt. Dieser Versuchsaufbau entspricht einem gängigen Verfahren zur Stimulation von T-Lymphozyten und Blockierung der Zytokinsekretion.

Im Anschluss wurden die Zellen wie unter Punkt 2.2.5.3. beschrieben fixiert, permeabilisiert und im FACS analysiert. Als Kontrolle dienten frisch isolierte T-Zellen, die ohne dendritische Zellen nur mit PMA, Ionomycin und Brefeldin A in denselben Zeiträumen inkubiert wurden.

2.2.6 *Statistische Auswertung*

Die Ergebnisse sämtlicher Experimente sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SEM) dargestellt. Die jeweilige Signifikanzberechnung erfolgte mit Hilfe des ungepaarten Student t-Tests, der unter Annahme unterschiedlicher Varianzen der Stichproben durchgeführt wurde. Entsprechend gängigen Kriterien gilt ein Unterschied als signifikant, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ ist.

3. Ergebnisse

3.1 Generierung der dendritischen Zelllinie NOD-DC1

Die Langzeitkultivierung der murinen Milzzellen in IMDM Medium mit GM-CSF und 3T3-Überstand führte zur Etablierung einer neuen Zelllinie, die als NOD-DC1 bezeichnet wurde. Diese Zellen wuchsen langsam, aber stabil über jetzt mehr als 24 Monate und sind streng abhängig von der Zugabe des Wachstumsfaktors GM-CSF und eines oder mehrerer bisher unbekannter Faktoren im 3T3-Überstand. Das Entfernen eines dieser Faktoren führt zur sofortigen Abnahme der Zellproliferation und anschließend zum Zelltod.

Die mikroskopische Beobachtung des Zellwachstums zeigte eine koordinierte Änderung der Zellmorphologie abhängig von der Zeit seit dem letzten Aussäen und der Zelldichte. Nach Splitten der Zellen und dem Überführen auf eine neue Platte wuchsen die Zellen als einzelne, lose adhärenente Zellen mit nur wenigen langen Zellausläufern. Im zweiten Stadium formten die Zellen fokale Aggregate mit einigen runden Zellen im Zentrum. Nach weiterem Zellwachstum waren zunehmend runde bis ovale Zellen zu sehen, die die typische Morphologie von dendritischen Zellen besitzen, d.h. es sind zahlreiche zytoplasmatische Ausläufer zu sehen. Diese Zellen saßen meist als Zellhaufen auf adhärenenten Zellen oder flotierten als Einzelzellen frei im Medium (Abb. 3.1). Die Hypothese, dass die unterschiedliche Morphologie vom Reifungsgrad der Zellen abhängig ist, konnte bestätigt werden durch die Beobachtung, dass die Zellen im ersten Stadium durch die Zugabe von Aktivierungssignalen wie z.B. LPS rasch in das dritte Stadium überführt werden können.

Nach der Etablierung der Zelllinie konnten die dendritischen Zellen kontinuierlich in ausreichender Menge angezüchtet werden, so dass jeweils etwa in 14-tägigem Abstand eine durchschnittliche Anzahl von 1×10^6 Zellen für Experimente zur Verfügung stand. Die Qualität der Zelllinie wurde in regelmäßigen Abständen unter dem Lichtmikroskop und zusätzlich zu durchflusszytometrischen Analysen begutachtet. Für alle nachfolgenden Experimente wurden die Zellen nach dem Erreichen einer Konfluenz von 70-90% geerntet.

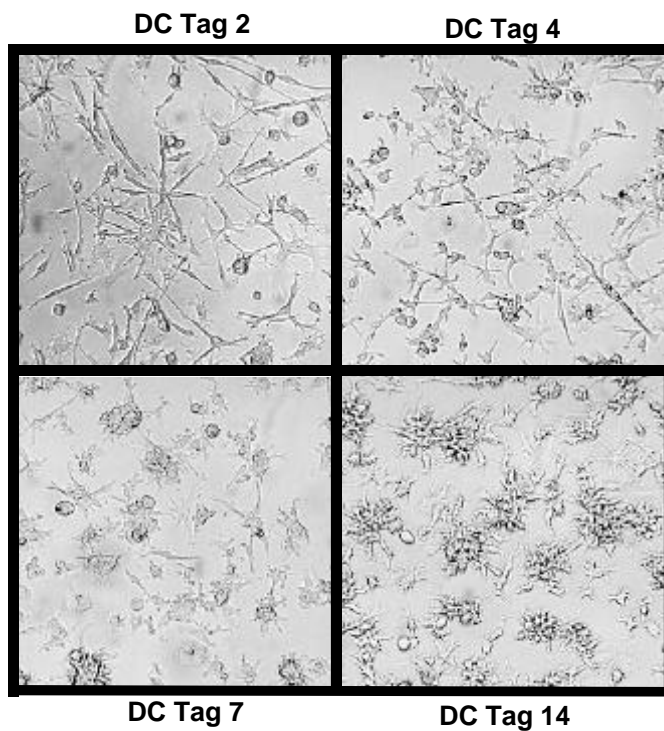


Abbildung 3.1: Mikroskopische Aufnahme der NOD-DC1 Zelllinie zu verschiedenen Zeiten nach dem Aussäen auf eine neue Platte. Mit zunehmender Zelldichte entwickeln sich Zellhaufen mit Zellen, die die typische Morphologie von dendritischen Zellen zeigen.

3.2 Herstellung von dendritischen Zellen aus Knochenmark

Das beschriebene Protokoll zur Anzucht von dendritischen Zellen aus murinem Knochenmark liefert eine zweite Möglichkeit, große Mengen dendritischer Zellen in relativ kurzer Zeit zu erhalten. Der Erfolg konnte während der Kulturperiode unter dem Mikroskop begutachtet werden. Abschließende durchflusszytometrische Analysen bestätigten die Reinheit der erhaltenen Zellkultur.

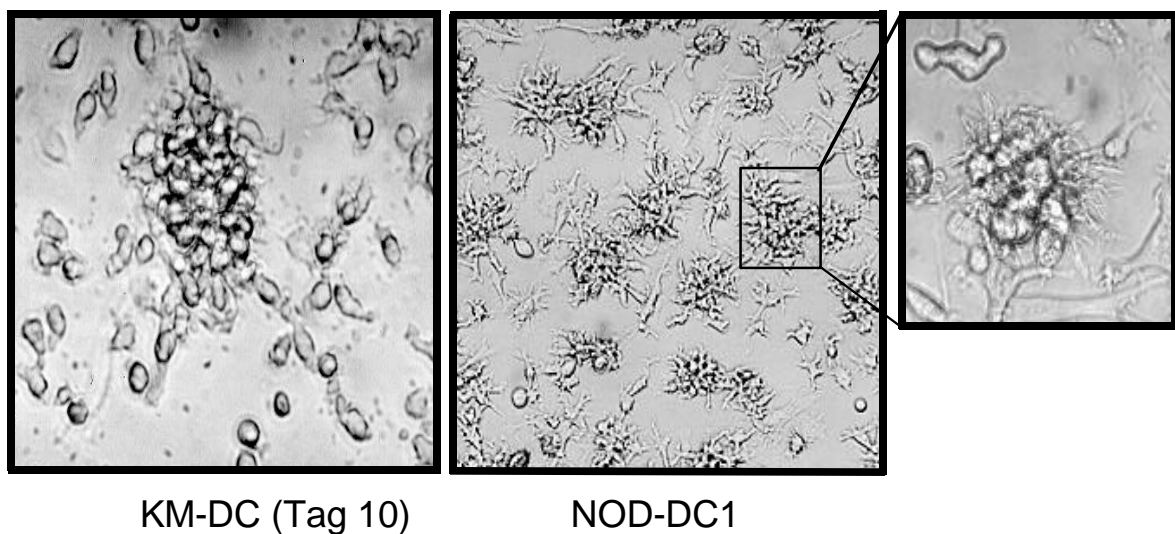


Abbildung 3.2: Mikroskopische Aufnahme der dendritischen Zellen isoliert aus dem Knochenmark und der NOD-DC1 Zelllinie. In die Vergrößerung sind die charakteristischen feinen Ausläufer der reifen DC zu erkennen.

3.3 Durchflusszytometrische Auswertung der dendritischen Zelllinie NOD-DC1

Zur Durchflusszytometrie wurden die dendritischen Zellen nativ der Kulturplatte entnommen; eine Fixierung der Zellen wurde nicht durchgeführt. Um die Zelllinie in ihrer Qualität zu kontrollieren, wurde zu Beginn jeder durchflusszytometrischen Analyse eine Darstellung der Größe und Granulierung der untersuchten Zellen angefertigt. Dadurch konnte gewährleistet werden, dass über die Zeit eine konstant homogene Zellpopulation angezchtet worden ist.

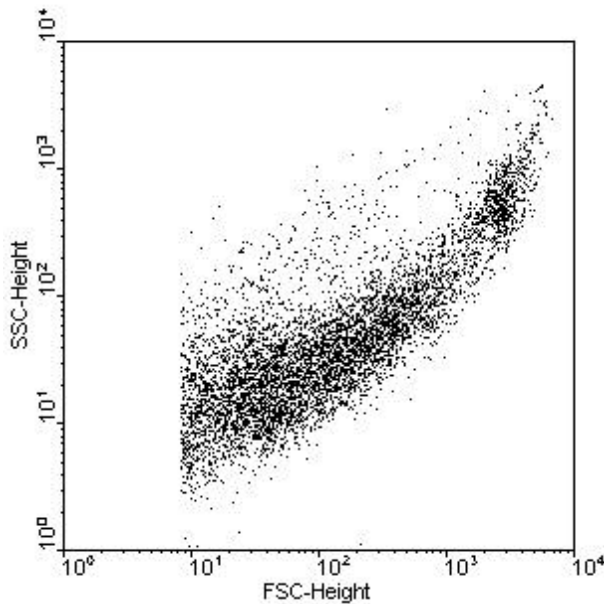


Abbildung 3.3: Darstellung von Größe und Granulierung der dendritischen Zellen. Es handelt sich bei dieser Darstellung um unbehandelte Zellen. Sie ist repräsentativ für sämtliche Analysen der Zelllinie.

Um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern, war es notwendig, die F_C -Rezeptoren der Zellen zu blockieren, die auf dendritischen Zellen nachgewiesen wurden. Es erschien sinnvoll, gepooltes Mausserum zum Blockieren zu verwenden, um eine sichere Blockade zu erreichen. Die anschließenden Analysen im Durchflusszytometer bestätigten dies durch fehlende Markierung mit dem spezifisch gegen F_C -Rezeptoren gerichteten Antikörper CD 16/32, wie in Abbildung 3.4 dargestellt.

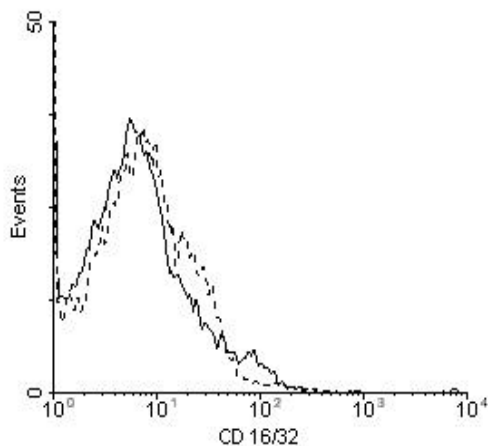


Abbildung 3.4: Darstellung repräsentativer Ergebnisse der Markierung dendritischer Zellen mit anti-CD 16/32 – IgG nach 10minütiger Inkubation mit 10 % gepooltem Mausserum.

Die unterbrochene Kurve stellt die Isotypkontrolle dar.

Von besonderer Wichtigkeit war es, die Färbung mit monoklonalen Antikörpern in eiskaltem PBS und auf Eis durchzuführen. Da dendritische Zellen, wie andere antigenpräsentierenden Zellen, Proteine phagozytieren können, besteht diese Gefahr ebenso für Antikörper während des Färbeporgangs. Wird dies nicht verhindert, resultiert eine unspezifisch positive Markierung der Zellen in der durchflusszytometrischen Analyse. Mit Markierungsvorgängen auf Eis konnte dies wirkungsvoll verhindert werden, wie Negativ- und Isotypfärbungen beweisen.

Als spezifischer Erkennungsmarker für dendritische Zellen wurden zum einen der Antikörper der gegen das Oberflächenantigen CD 11c gerichtet ist, sowie der anti-DEC-205 Antikörper mit der Bezeichnung NLDC 145 gewählt. Weitere Oberflächenantigene wurden mit monoklonalen Antikörpern, die spezifisch gegen CD 11b, CD 40, CD 80, CD 86, MHC II (spezifische Bezeichnung des MHC II-Moleküls bei NOD-Mäusen: I-A^k) und MIDC-8 gerichtet waren, untersucht.

Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurden nur Partikel oberhalb einer bestimmten Größe registriert. Dazu wurde am Durchflusszytometer eine Grenze („threshold“) von $200 \times e^{-1}$ eingestellt; Partikel unterhalb dieser Grenze flossen nicht in die Registrierung ein. Diese Grenze wurde nach Erfahrungswerten gewählt, wie sie bei durchflusszytometrischen Analysen von diversen Zellkulturen, sowie von Vollblutproben gewonnen worden waren. Bei

weiterem Absenken der Grenze wurde das Ergebnis durch starke unspezifische Signale verfälscht.

Die analysierten Zellen wiesen eine starke Expression der für dendritische Zellen charakteristischen Oberflächenantigene CD 11c und DEC-205 auf. Beide Antigene sind unabhängig vom Ausreifungsstadium auf dendritischen Zellen vorhanden. Ebenso wurde das intrazelluläre Protein MIDC-8 stark detektiert, was einen weiteren Erkennungsmarker für dendritische Zellen darstellt. Hinweise auf die funktionellen Eigenschaften der untersuchten Zelllinie ergaben die positiven Analysen der Marker CD 40, CD 80 und CD 86 (sogenannte kostimulierende Faktoren auf antigenpräsentierenden Zellen) sowie auf MHC II (I-A^k). Die Expression dieser Marker zusammen mit der stark positiven Färbung auf CD 11b zeigt, dass die NOD-DC1 Zellen einen charakteristischen Phänotyp von reifen dendritischen Zellen aufweisen, die von der myeloischen Zellreihe abstammen.

Eine Stimulation der Zellen mittels LPS zu maximal 1 µg/ml oder TNFα zu 1000 U/ml erbrachte eine geringe, aber nicht signifikante Hochregulation der Expression von Aktivierungsmarkern wie CD 40, CD 80, CD 86 und MHC II.

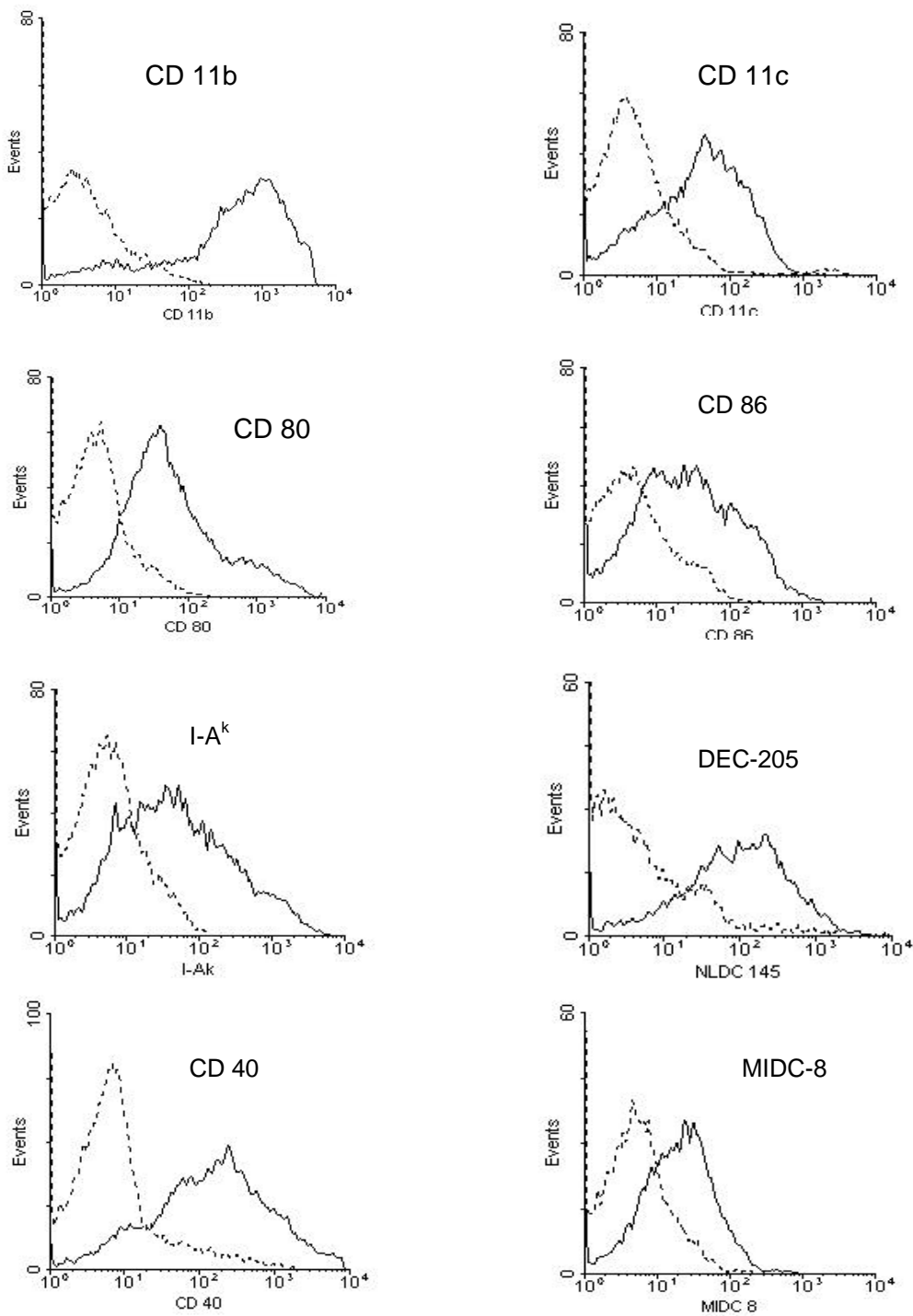


Abbildung 3.5: Darstellung repräsentativer Ergebnisse der FACS[®] Analyse exprimierter Oberflächenmarker und des intrazellulären Moleküls MIDC 8 der Linie NOD-DC1 als Histogramm; logarithmische Auftragung der Fluoreszenzintensität auf der Abszisse, lineare Auftragung der Anzahl entsprechend detektierter Zellen auf der Ordinate. Unterbrochene Linie: Darstellung der jeweiligen Isotypenkontrolle.

Um die Zelllinie umfassend zu charakterisieren, war es nötig, weitere Oberflächenantigene zu untersuchen. Dabei wurde das Augenmerk besonders auf spezielle Antigene gerichtet, die sich spezifisch auf weiteren Zellen des Immunsystems befinden. Diese Untersuchung war als Negativkontrolle konzipiert und umfasste den Einsatz von Antikörpern gegen CD 4, CD 8, CD 14, CD 19, CD 34 und F 4/80. Die Auswertung in Hinblick auf diese Oberflächenmarker ergaben negative, beziehungsweise sehr gering positive Ergebnisse, wie in Abbildung 3.6 aufgeführt. Dies ergänzt die oben angeführten positiven Auswertungen und unterstreicht die Reinheit der entwickelten Zelllinie.

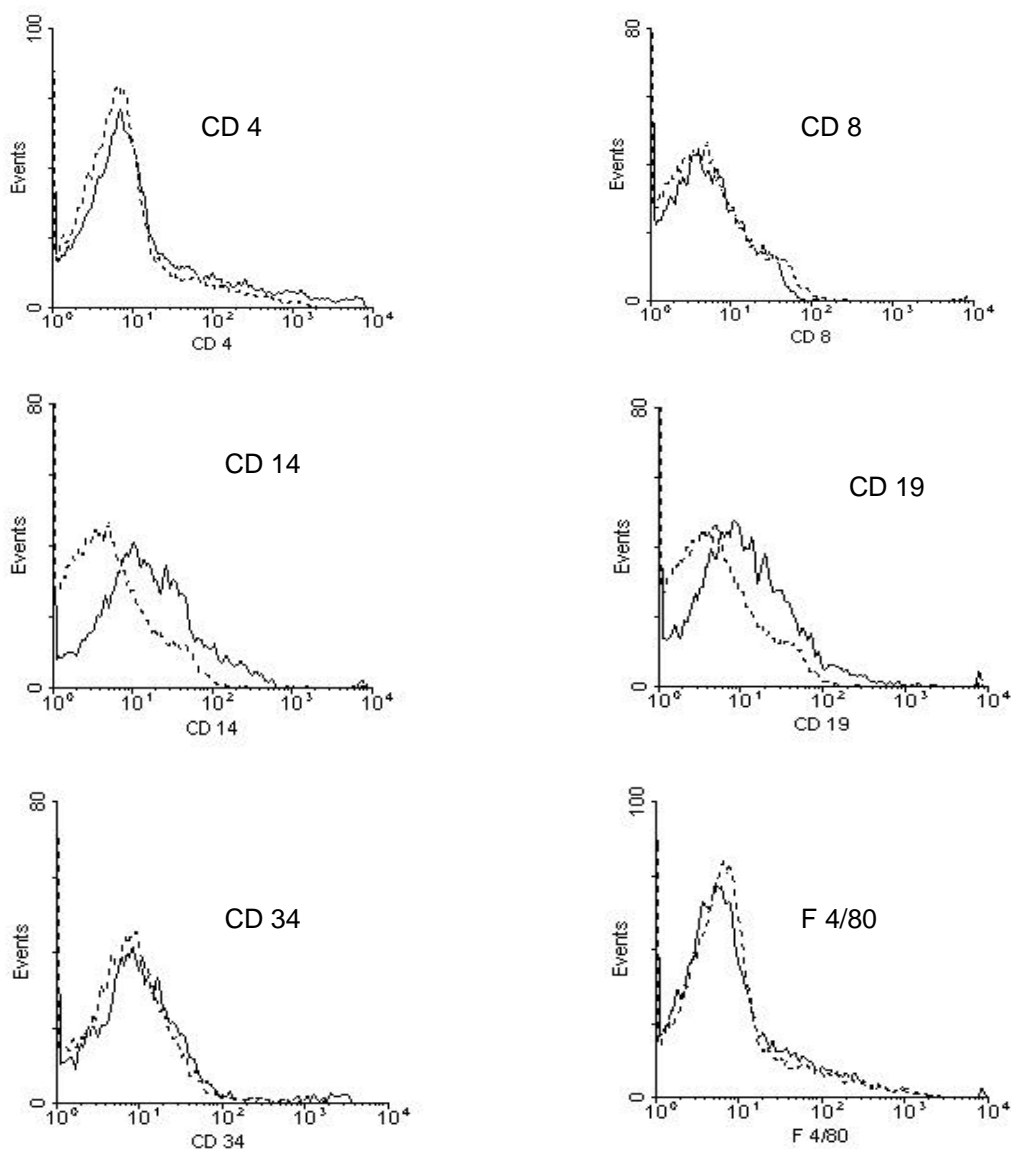


Abbildung 3.6: Darstellung repräsentativer Ergebnisse der FACS[®] Analyse nicht oder schwach exprimierter Oberflächenmarker der Linie NOD-DC1 als Histogramm; logarithmische Auftragung der Fluoreszenzintensität auf der Abszisse, lineare Auftragung der Anzahl entsprechend detektierter Zellen auf der Ordinate.

Unterbrochene Linie: Darstellung der jeweiligen Isotypenkontrollen.

Wie die zum Teil vollständige Überlappung der Kurven für die Oberflächenmarker und ihrer Isotypenkontrollen zeigt, ist die Verunreinigung der Zellkultur mit weiteren Zellen des murinen Immunsystems sehr gering. Dies beweist den Erfolg bei der Herstellung einer permanenten Zelllinie dendritischer Zellen.

Tabelle 3.1: Prozentsätze dendritischer Zellen der Linie NOD-DC1 bezüglich ihrer Expression spezieller Oberflächenmarker

<i>Antigen</i>	<i>Mittelwert (%)</i>	<i>Standardabweichung</i>	<i>n</i>
CD 11b	67,4	13,1	5
CD 11c	55,9	6,4	8
CD 40	68,0	15,2	6
CD 80	62,7	5,6	8
CD 86	50,7	7,6	8
MHC II	41,8	8,1	8
DEC-205	53,5	10,0	6
MIDC-8	25,5	17,3	3
CD 4	1,9	1,2	5
CD 8	1,6	1,6	4
CD 14	5,5	2,5	5
CD 19	4,4	2,1	5
CD 34	6,5	3,2	5
F 4/80	2,1	2,6	5

Außerdem wurden Versuche unternommen, inwieweit sich die Differenzierung der NOD DC1 Zellen ändert, wenn M-CSF anstatt GM-CSF als Wachstumsfaktor eingesetzt wird. Nach 7 Tagen Stimulation mit M-CSF war keine Differenzierung der Zelllinie in Richtung Makrophagen zu beobachten, was durch die negative Anfärbung mit dem Makrophagen-spezifischen Marker F 4/80 bestätigt werden konnte (Abb. 3.7).

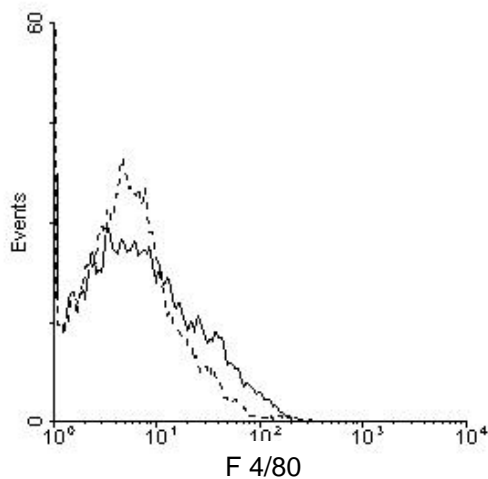


Abbildung 3.7: Logarithmische Auftragung der Fluoreszenzintensität dendritischer Zellen bezüglich des Markers F4/80 der Linie NOD-DC1 nach 7tägiger Stimulation mit M-CSF; die unterbrochene Linie stellt die Isotypenkontrolle dar.

3.4 Durchflußzytometrische Analyse von Knochenmark – DC's

Die Oberflächencharakterisierung der dendritischen Zellen aus Knochenmarkanzucht wurde unter denselben Gesichtspunkten wie die der Zelllinie vorgenommen. In Anlehnung an das Protokoll von Inaba et. al. (1992) wurden Zellen des Knochenmarks über 7 Tage mit GM-CSF und IL-4 angezchtet. In den letzten zwei Tagen wurden diese Zellen mit TNF α ausgereift.

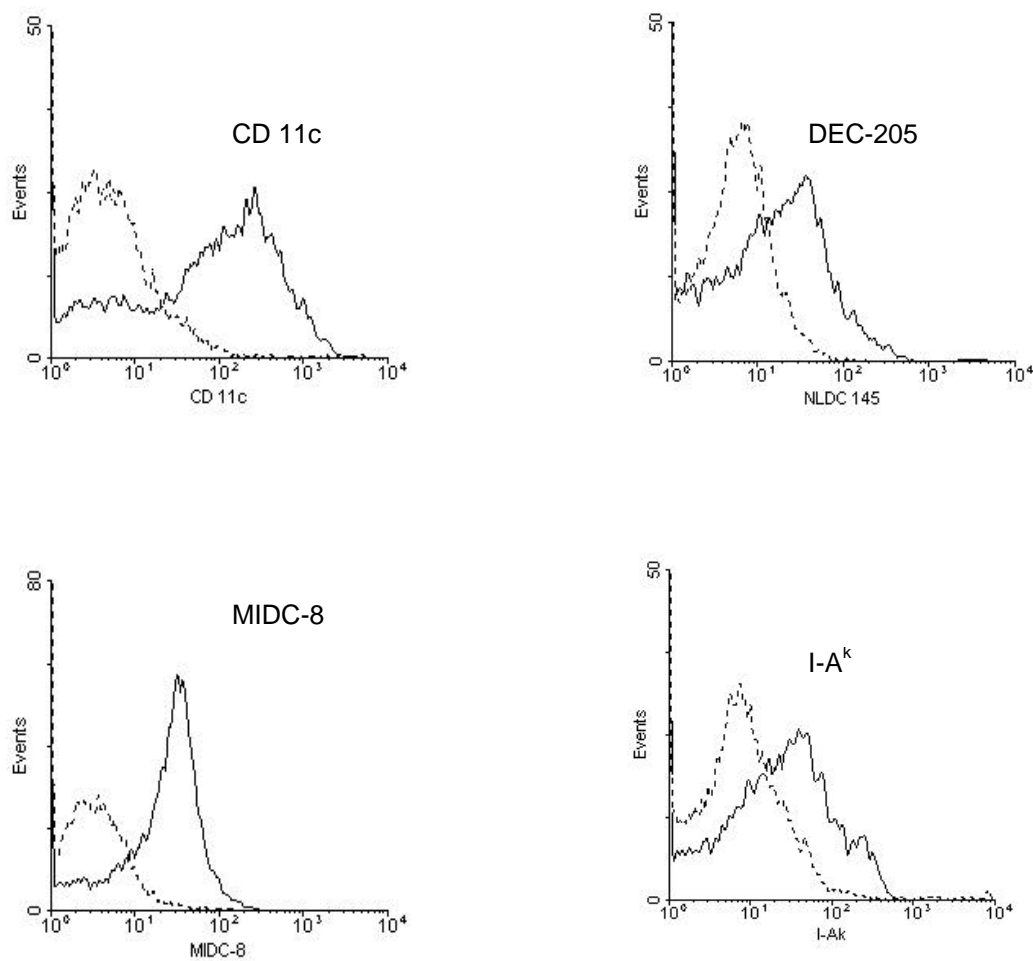


Abbildung 3.8: Durchflusszytometrische Analyse der dendritischen Zellen aus dem Knochenmark. Repräsentative Darstellung der Färbung spezifischer Marker für dendritische Zellen (CD 11c, DEC-205, MIDC 8) und des MHC Klasse II Moleküls I-A^k. Logarithmische Auftragung der Fluoreszenzintensität der Zellen auf der Abszisse, lineare Auftragung der Anzahl entsprechend detektierter Zellen auf der Ordinate.

Unterbrochene Linie: Darstellung der Isotypenkontrolle.

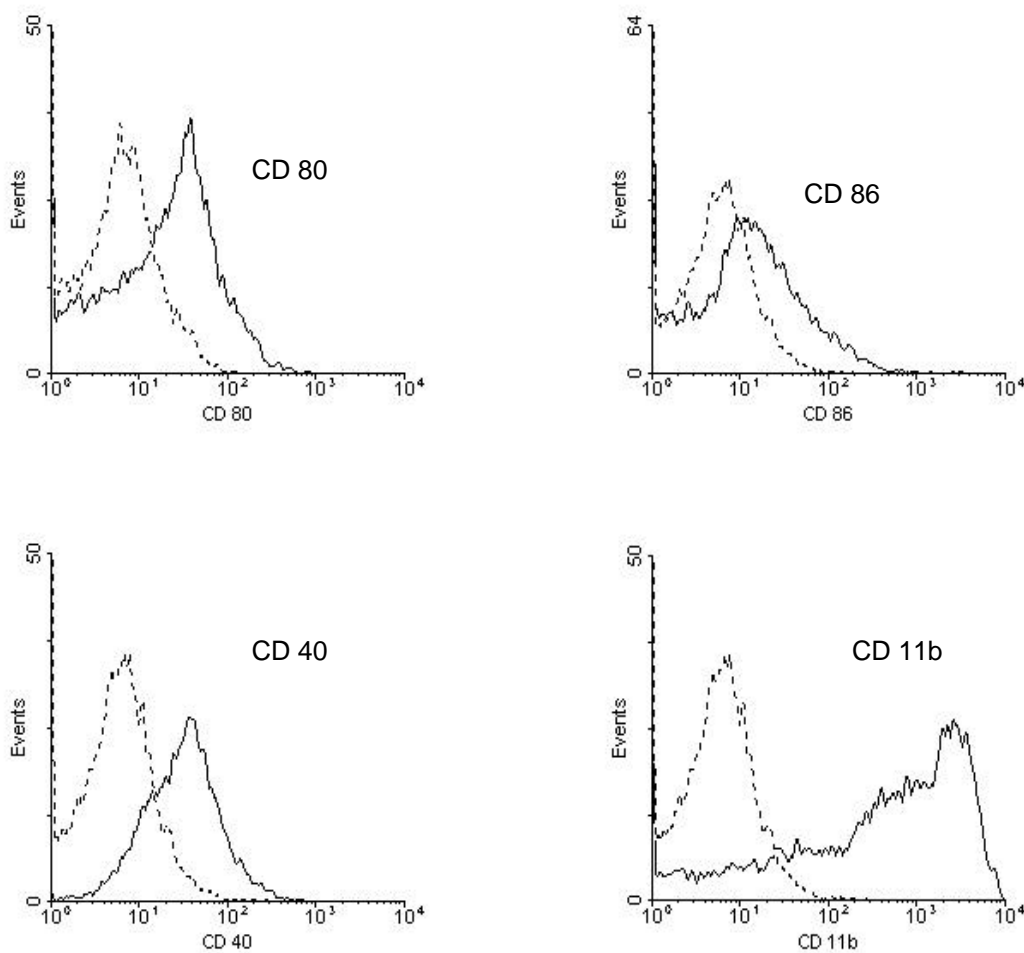


Abbildung 3.9: Durchflusszytometrische Analyse der dendritischen Zellen aus dem Knochenmark. Repräsentative Darstellung der Färbung spezifischer Marker für kostimulierende Moleküle (CD 40, CD 80, CD 86) und den myeloischen Marker CD 11b. Logarithmische Auftragung der Fluoreszenzintensität der Zellen auf der Abszisse, lineare Auftragung der Anzahl entsprechend detektierter Zellen auf der Ordinate. Unterbrochene Linie: Darstellung der Isotypenkontrolle

3.5 Untersuchung zur Antigenaufnahme der dendritischen Zellen

3.5.1 Darstellung der Pinozytoseeigenschaft der dendritischen Zellen

Um die Pinozytosefähigkeit der Linie NOD-DC-1 zu demonstrieren, bot sich die Analyse der Inkorporation eines löslichen Proteins mit Hilfe durchflusszytometrischer Methoden als sehr anschaulich an. Nach der Inkubation der NOD DC1 Zellen konnte eine eindeutige zeitabhängige Aufnahme von FITC-Albumin beobachtet werden. Die Gegenfärbung mit PE-anti-CD 11b belegt die Aufnahme in die NOD-DC1 Zellen. Abb. 3.10 zeigt die zunehmende FITC Fluoreszenzintensität der CD 11b positiven Zellen über die Zeit.

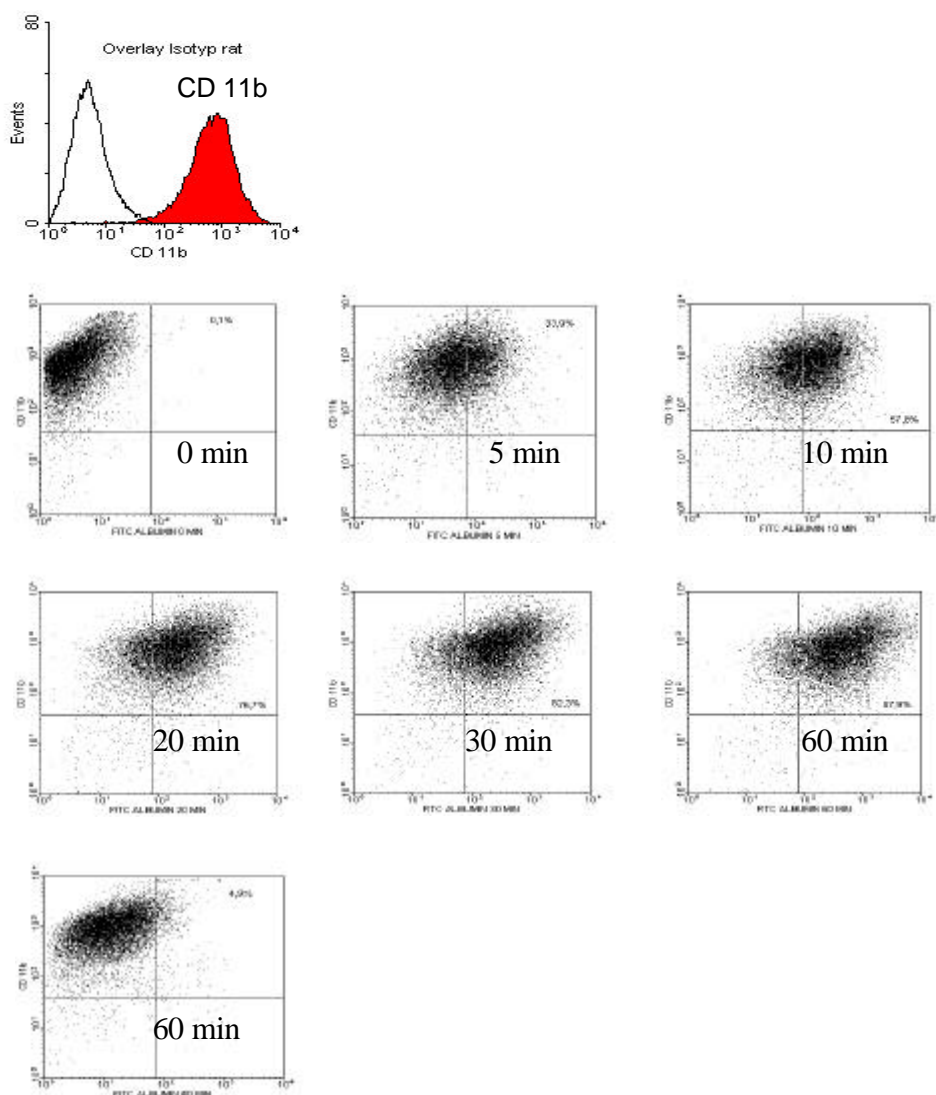


Abbildung 3.10: Durchflusszytometrische Analyse der dendritischen Zellen nach Zugabe von FITC-markierten Albumin und Inkubation bei 37°C (5, 10, 20, 30 und 60 min, A) und bei 4°C (60 min, B). Repräsentative Darstellung nach Färbung mit einem PE-markierten CD 11b Antikörper (Abszisse). Auf der Ordinate ist die Intensität der FITC Färbung angegeben.

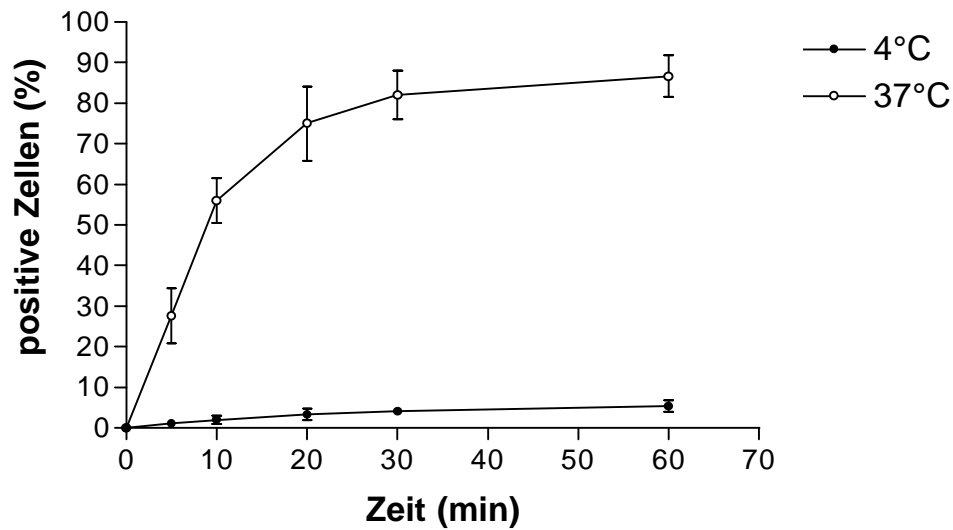
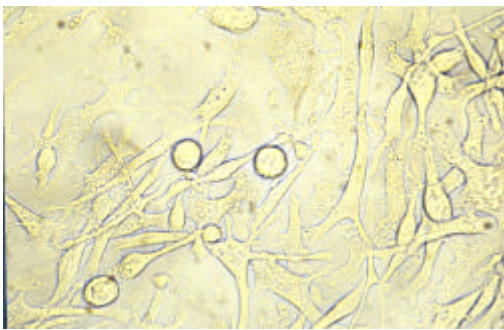


Abbildung 3.11: Aufnahme von FITC markiertem Albumin über die Zeit bei Inkubation in 37°C und 4°C. Dargestellt ist die Zahl der CD 11b und FITC-positiven dendritischen Zellen in Prozent der Gesamtzellpopulation.

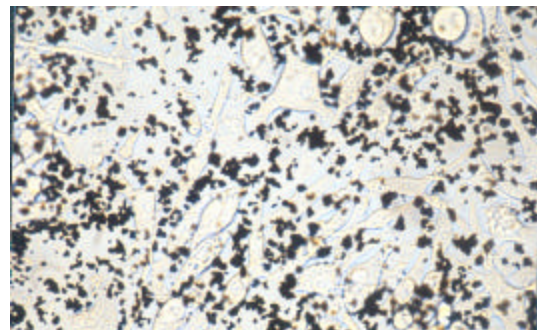
Der Versuch zeigt eine schnelle Aufnahme von FITC-Albumin durch die NOD-DC1 Zellen. Nach 60 min hatten 87% aller Zellen das Protein aufgenommen. Durch die parallele Inkubation bei 4°C konnte eine unspezifische Adsorption von FITC-Albumin an die Zelloberfläche ausgeschlossen werden.

3.5.2 Phagozytose

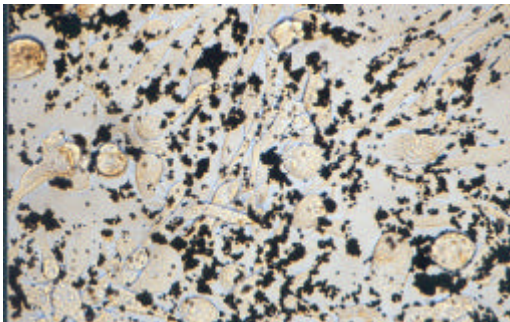
Eine Möglichkeit, die Phagozytosefähigkeit der entwickelten Zelllinie darzustellen, war eine mikroskopische Dokumentation mithilfe von Goldpartikeln. Diese Partikel besaßen mit 1 μm Durchmesser zum einen eine optimale Größe, um von dendritischen Zellen aufgenommen zu werden, zum anderen auch eine ausreichende Größe, um unter dem Mikroskop deutlich erkannt zu werden.



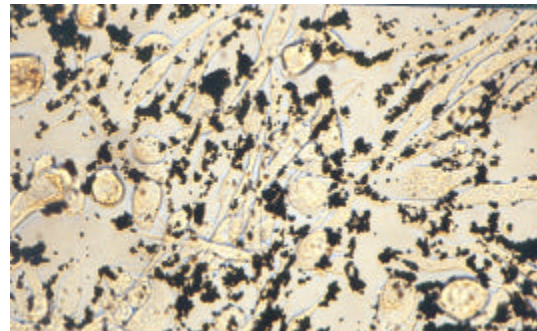
a)



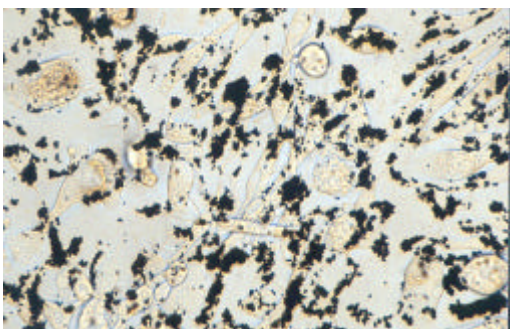
b)



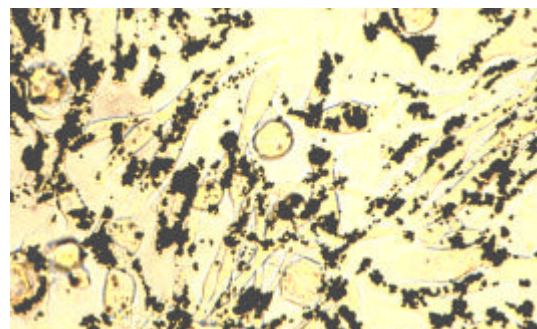
c)



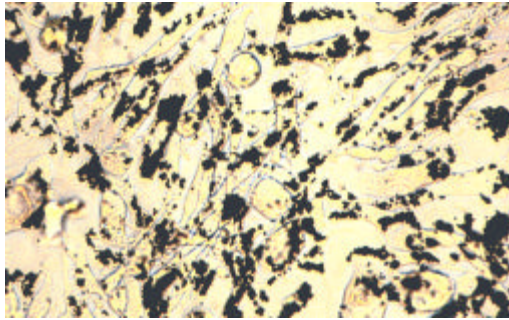
d)



e)



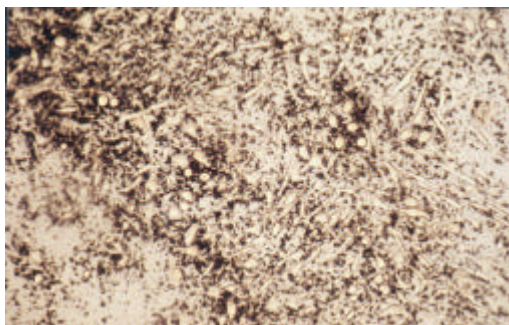
f)



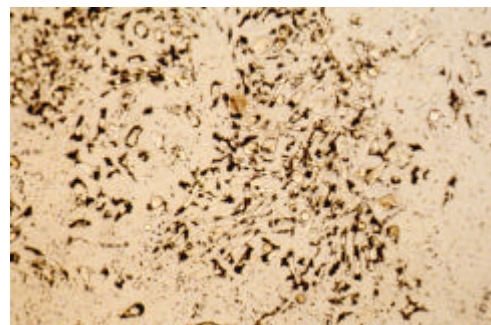
g)

Abbildung 3.12: Mikroskopische Aufnahmen der Zelllinie NOD-DC1 des Experiments der Phagozytose von Goldpartikeln; es wurden für jeden Zeitabschnitt ähnliche Bildausschnitte gewählt.

- a) DC vor Zugabe von Goldpartikeln, 320fach
- b) DC unmittelbar nach Zugabe von Goldpartikeln, 320fach
- c) DC 15 Minuten nach Zugabe von Goldpartikeln, 320fach
- d) DC 30 Minuten nach Zugabe von Goldpartikeln, 320fach
- e) DC 45 Minuten nach Zugabe von Goldpartikeln, 320fach
- f) DC 60 Minuten nach Zugabe von Goldpartikeln, 320fach
- g) DC 80 Minuten nach Zugabe von Goldpartikeln, 320fach



a)



b)

Abbildung 3.13: Ansatz wie unter Abb. 3.5

- a) DC unmittelbar nach Zugabe von Goldpartikeln, 100fach
- b) DC 80 Minuten nach Zugabe von Goldpartikeln, 100fach

Diese Bilder beweisen eindrucksvoll die Fähigkeit der dendritischen Zellen, die Goldpartikel aus ihrer Umgebung zunächst förmlich an sich zu ziehen und anschließend aufzunehmen. Unter 320facher Vergrößerung erkennt man deutlich, dass sich die Partikel innerhalb der Zellgrenzen befinden (Abbildungen 3.12 f und g). Die Aufnahmen mit 100facher Vergrößerung in Abbildung 3.13 zeigen im Überblick die anfangs ungeordnete Verteilung der Goldpartikel und nach 80 Minuten deren fast vollständige Aufnahme durch die dendritischen

Zellen. Zum Teil ist das gesamte Zytoplasma mit Goldpartikeln ausgefüllt, so dass nur der Bereich des Zellkerns ausgespart bleibt. Nach 60 Minuten wurde keine weitere signifikante Phagozytose von Partikeln beobachtet. Aufnahmen, die 18 Stunden nach Zugabe der Goldpartikel gemacht wurden zeigen, dass keine weiteren Partikel aufgenommen worden sind (nicht dargestellt). Obige Fotografien zeigen ebenso, dass adhärenente dendritische Zellen, zu erkennen an den langen Fortsätzen, besser zur Phagozytose der Goldpartikel befähigt sind als solche, die vom Boden der Kulturschale abgelöst sind und somit abgerundet erscheinen. Aufgrund dessen war es wichtig darauf zu achten, dass bei der Zugabe der Goldpartikel die auf dem Boden der Platten haftenden Zellen nach Möglichkeit nicht abgelöst wurden.

Dendritische Zellen aus Knochenmarkanzucht wurden ebenfalls auf ihre Fähigkeit zur Phagozytose untersucht. Dazu wurde obiger Versuch mit Goldpartikeln durchgeführt. Hier wurden mikroskopische Fotoaufnahmen vor und 45 Minuten nach Zugabe der Goldpartikel angefertigt.

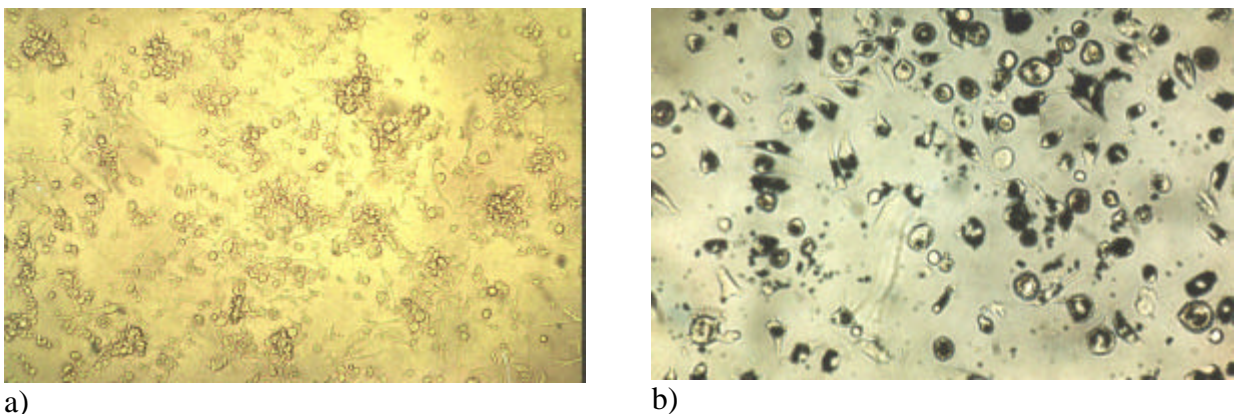


Abbildung 3.14: Mikroskopische Aufnahmen dendritischer Zellen aus Knochenmarkanzucht im Experiment der Phagozytose von Goldpartikeln.

a) BMDC vor Zugabe von Goldpartikeln, 100fach

b) BMDC 45 Minuten nach Zugabe von Goldpartikeln, 320fach

Neben der mikroskopischen Analyse der Phagozytose wurden Versuche mit FITC-markierten Latex Beads durchgeführt, die eine Größe von $1,1 \mu\text{m}$ besaßen. Nach der Zugabe von 1×10^7 Beads wurde wie für die Pinozytose eine zeit- und temperaturabhängige Aufnahme der Partikel beobachtet. Nach 60 min konnte bei 41% der CD 11b positiven Zellen ein FITC-Signal detektiert werden. Dem gegenüber waren nur 3% der Zellen nach 60 min FITC-positiv wenn die Inkubation bei 4°C durchgeführt wurde (Abb. 3.15).

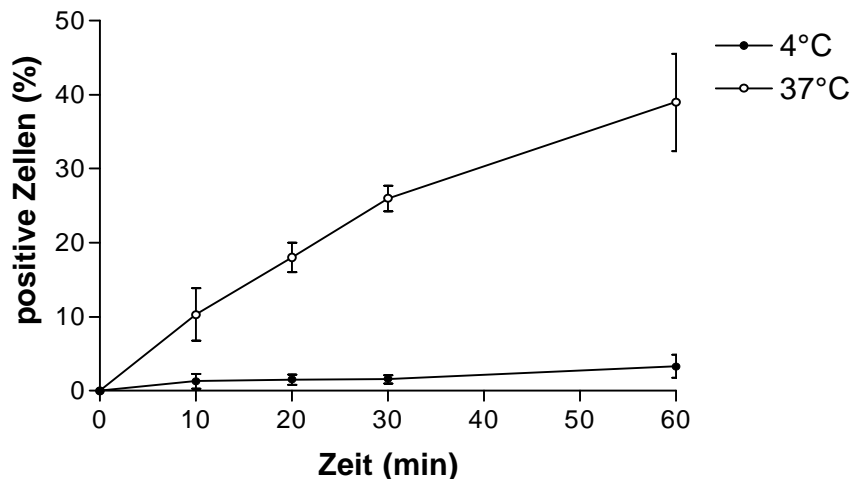


Abbildung 3.15: Aufnahme von FITC-Latex Beads über die Zeit bei Inkubation bei 37°C und bei 4°C. Dargestellt ist die Zahl der CD 11b und FITC-positiven dendritischen Zellen in Prozent der Gesamtzellpopulation.

3.6 Ermittlung der Zytokinproduktion der Linie NOD-DC-1 mittels ELISA

Eine wesentliche Funktion der dendritischen Zellen ist die stimulusabhängige Produktion und Sekretion von Zytokinen. Diese initiieren und modulieren die Immunreaktion, indem sie wichtige Signalstoffe für weitere Zellen des Immunsystems darstellen. Die Zytokinproduktion wird insbesondere nach Stimulation der Zellen erwartet. In dieser Arbeit wurden die Zellen mit LPS, TNF α und anti-CD 40 Antikörper stimuliert und die Konzentrations- und Zeitabhängigkeit ermittelt.

Die ELISA-Platten wurden unverzüglich nach Beendigung des Protokolls im ELISA-Reader als Endpunktmessung analysiert.

Nach der Stimulation mit LPS über 24 Std. konnte eine konzentrationsabhängige Sekretion von IL-6, TNF- α und IL-1 β beobachtet werden (Abb. 3.16 - 3.18 und Tabelle 3.2).

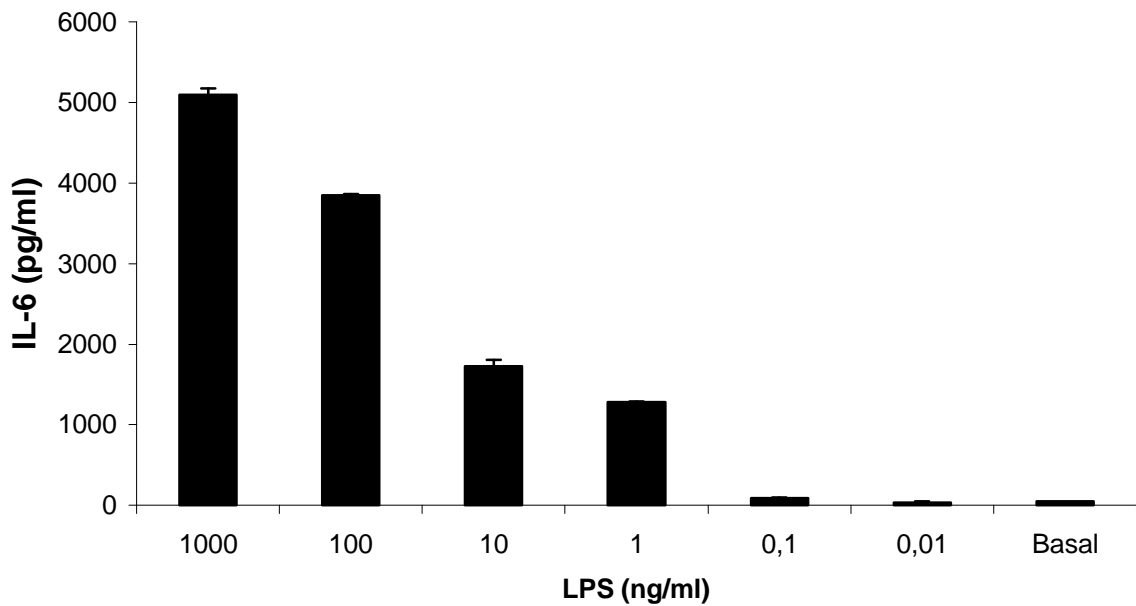


Abbildung 3.16: IL-6 Sekretion dendritischer Zellen der Linie NOD-DC1 nach konzentrationsabhängiger Stimulation mit LPS über 24 Std.; Darstellung der Mittelwerte (n = 3).

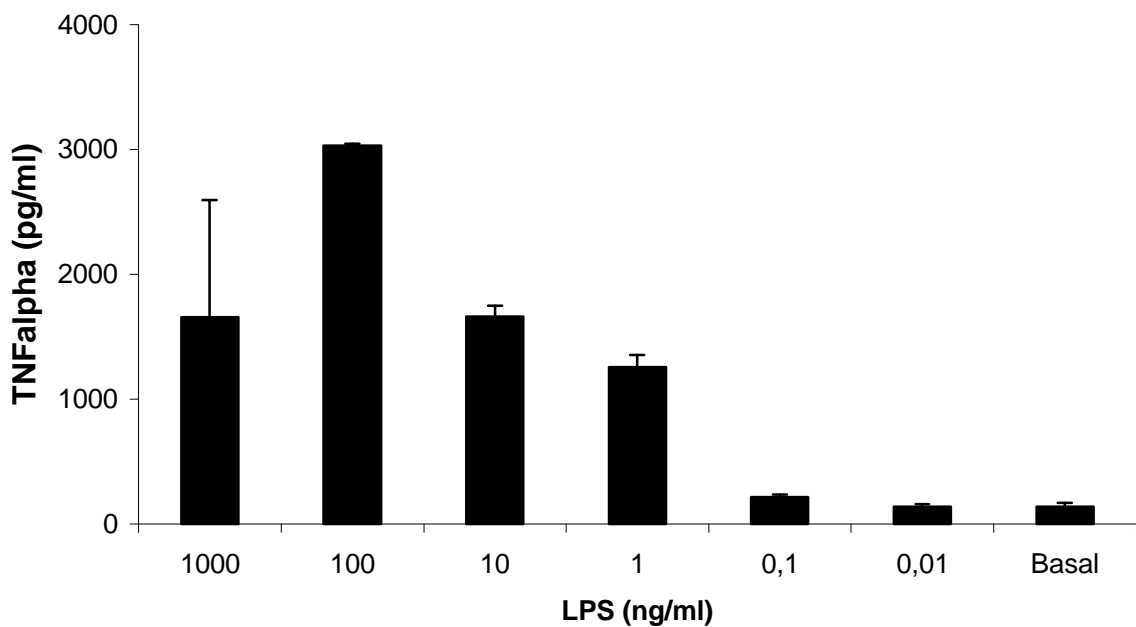


Abbildung 3.17: TNF α Sekretion dendritischer Zellen der Linie NOD-DC1 nach konzentrationsabhängiger Stimulation mit LPS; Darstellung der Mittelwerte (n = 3).

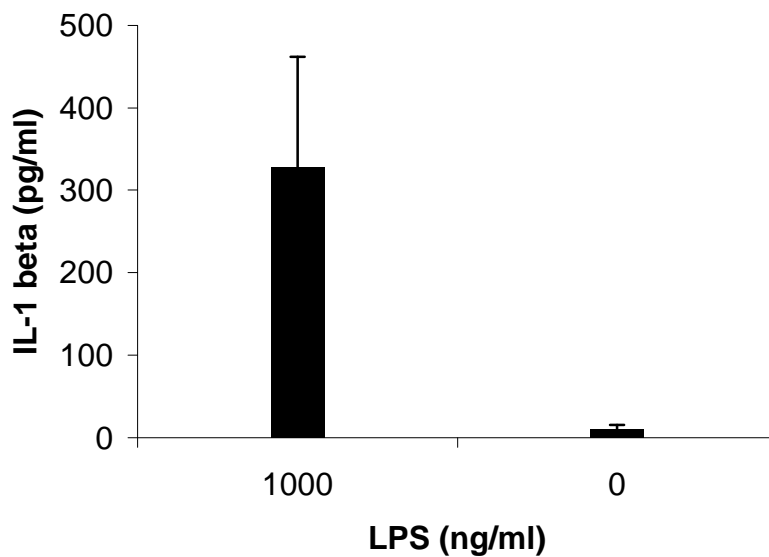


Abbildung 3.18: IL-1 β Sekretion dendritischer Zellen der Linie NOD-DC1 nach Stimulation mit 1000 ng / ml LPS im Vergleich zum Basalwert; Darstellung der Mittelwerte (n = 4).

Tabelle 3.2: Sekretion von IL-6, TNF- α und IL-1 β nach Stimulation mit LPS; Angabe in pg/ml

	LPS (ng/ml)						
	basal	0,01	0,1	1	10	100	1000
IL-6	46,8 ± 13,7	36,6 ± 6,8	92,2 ± 9,0	1278 ± 78,7	1727 ± 13,5	3852 ± 75,2	5097 ± 1683
TNF- α	138 ± 18,8	140 ± 18,1	218 ± 18,3	1258 ± 94,2	1660 ± 90,1	3028 ± 18,3	1659 ± 937
IL-1 β	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	328,5 ± 133,7

Eine signifikante Sekretion von IL-1 β ließ sich in Konzentrationen unter 1000 ng / ml LPS nicht feststellen. Nach Stimulation mit weniger als 1000 U/ml TNF α waren eine Sekretion aller gemessenen Zytokine nicht ermittelbar, beziehungsweise ergaben keinen signifikanten Unterschied zu unstimulierten Ansätzen.

Eine Stimulation mit anti-CD 40 Antikörper zeigte eine signifikante Erhöhung der Zytokinproduktion vor allem von TNF α und IL-6 (Abb. 3.25).

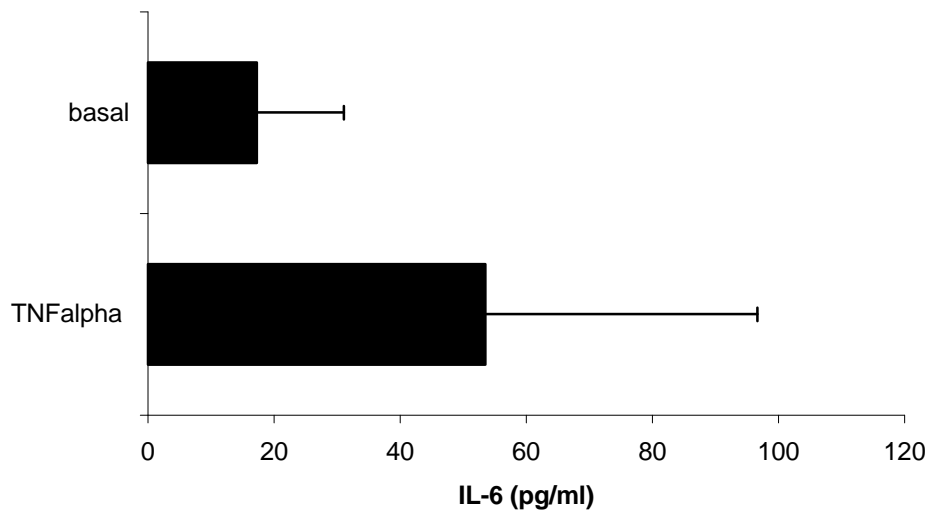


Abbildung 3.19: Sekretion von IL-6 der NOD-DC1 Zellen. Stimulation der Zellen mit 1000 U / ml TNF α für 24 Std. Darstellung der Mittelwerte aus 2 unabhängigen Versuchen.

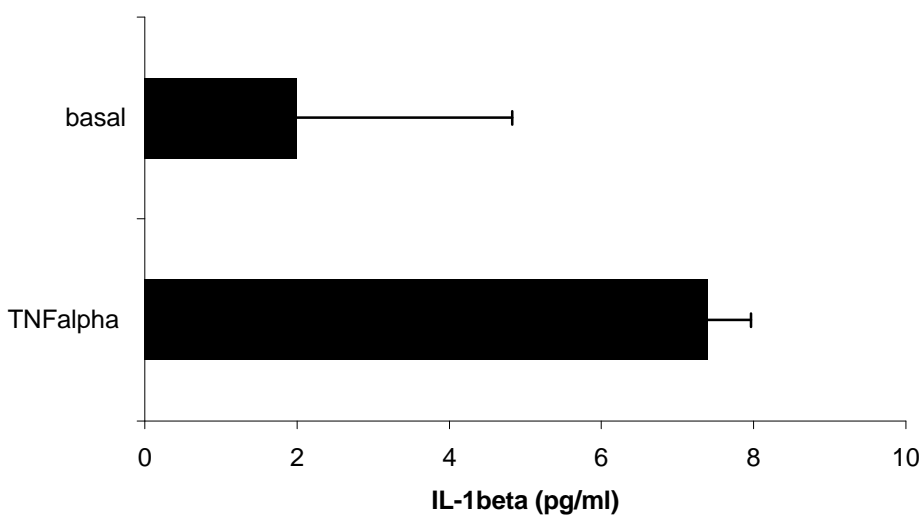


Abbildung 3.20: Sekretion von IL-1 β der NOD-DC1 Zellen. Stimulation der Zellen mit 1000 U/ml TNF α für 24 Std. Darstellung der Mittelwerte aus 2 unabhängigen Versuchen.

Nach Stimulation mit 1000 U /ml TNF α wurden $53,5 \pm 43,1$ pg / ml IL-6 und $7,4 \pm 0,57$ pg / ml IL-1 β sezerniert.

In einigen Arbeiten wurde gezeigt, dass IL-10 eine hemmende Wirkung auf dendritische Zellen hat. Hier wurde untersucht, ob IL-10 die durch LPS stimulierte Sekretion von IL-1 β , IL-6 und TNF α beeinflussen kann. Die folgenden Abbildungen zeigen Zytokinsekretionen einer Vorbehandlung der Zellen mit 10 ng / ml IL-10 für 5 Tage.

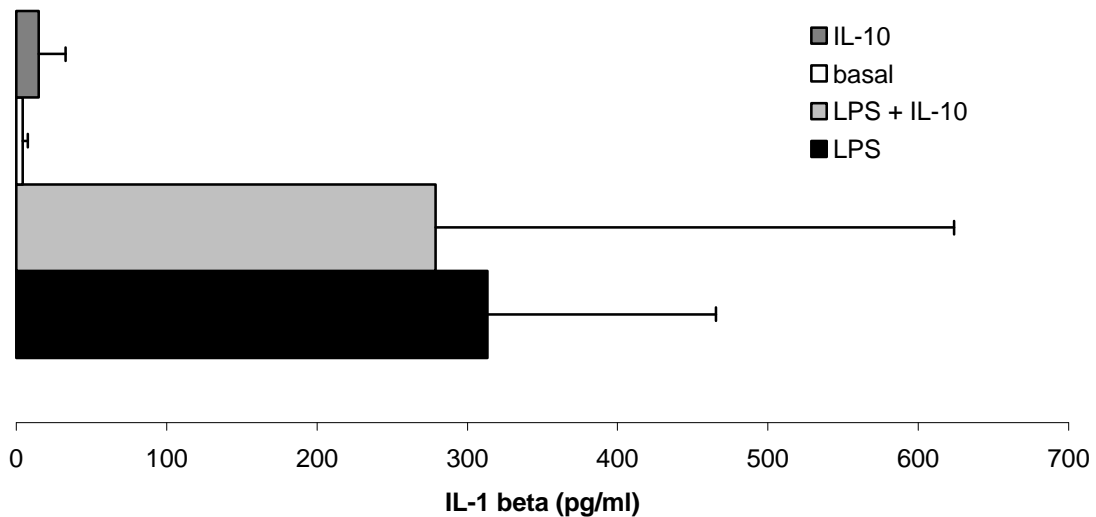


Abbildung 3.21: Sekretion von IL-1 β ohne und mit Vorbehandlung der NOD-DC1 Zellen mit IL-10 (10 ng / ml für 5 Tage). Stimulation der Zellen mit 1000 ng / ml LPS für 24 Std. Darstellung der Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen.

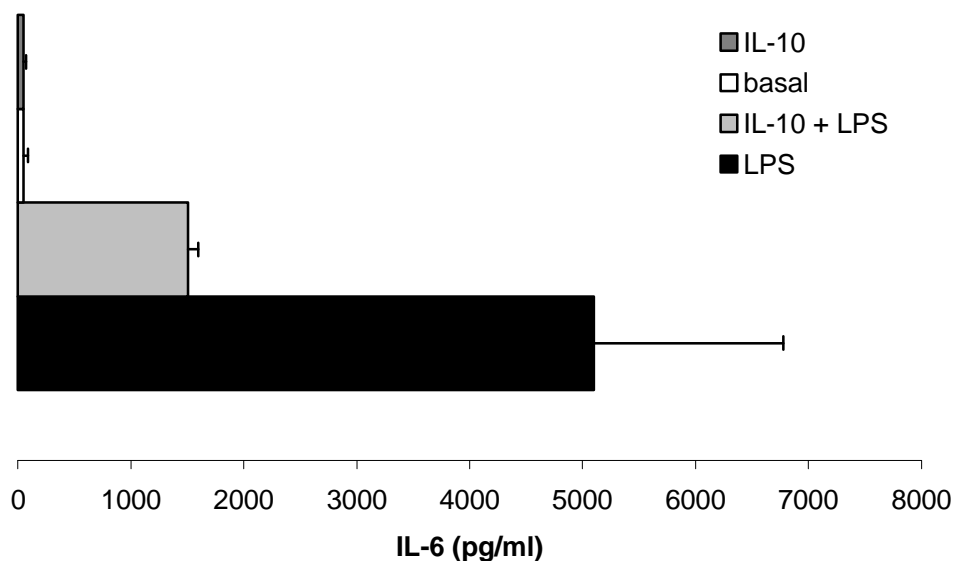


Abbildung 3.22: Sekretion von IL-6 ohne und mit Vorbehandlung der NOD-DC1 Zellen mit IL-10 (10 ng / ml für 5 Tage). Stimulation der Zellen mit 1000 ng / ml LPS für 24 Std. Darstellung der Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen.

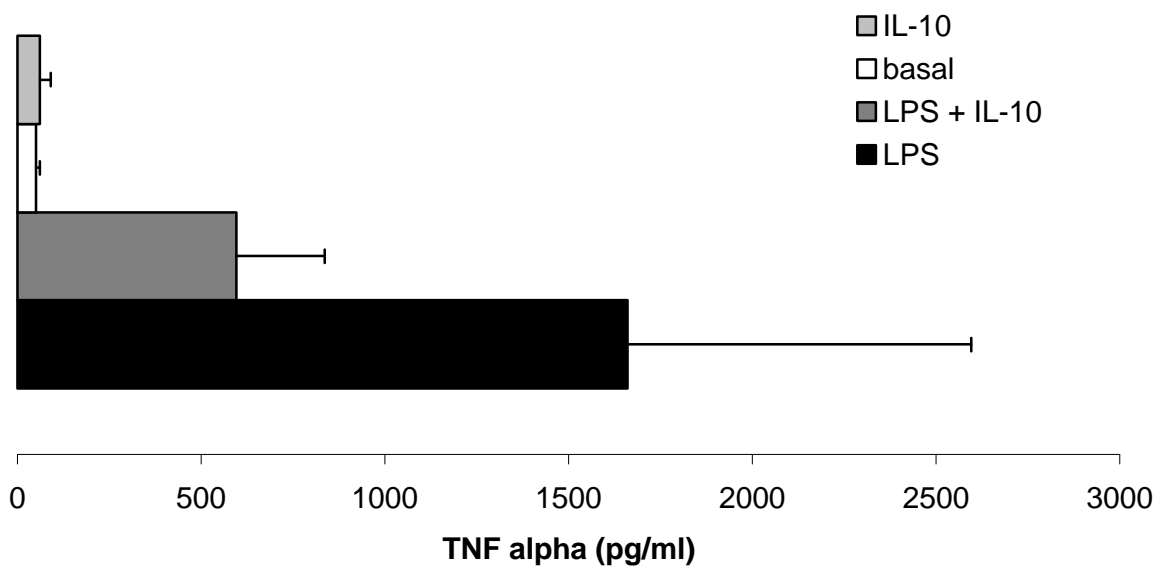


Abbildung 3.23: Sekretion von TNF α ohne und mit Vorbehandlung der NOD-DC1 Zellen mit IL-10 (10 ng / ml für 5 Tage). Stimulation der Zellen mit 1000 ng / ml LPS für 24 Std. Darstellung der Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen.

Nach einer Stimulation mit 1000 ng / ml LPS über 24 Std. wurden $313 \pm 152,7$ pg / ml IL-1 β sezerniert. Durch Vorbehandlung mit IL-10 wurde die IL-1 β Sekretion leicht gehemmt (279 ± 345 pg / ml). Die IL-6 Sekretion wurde durch IL-10 Behandlung von 5097 ± 1683 pg / ml auf 1504 ± 90 pg / ml gehemmt ($p < 0,07$). Eine ebenfalls signifikante Inhibition konnte bei der TNF α Sekretion beobachtet werden (Reduktion von 1659 ± 937 pg / ml auf 596 ± 239 pg / ml) ($p < 0,03$).

In weiteren Experimenten wurde die Zeitabhängigkeit der Zytokinsekretion nach Stimulation mit LPS und dem anti-CD 40 Antikörper untersucht. Hierzu wurden die NOD-DC1 Zellen mit 1000 ng/ml LPS oder 0,25 μ g/ml anti-CD 40 Antikörper für 24 h, 3 Tage und 7 Tage inkubiert. Gleichzeitig wurden die Zellen zum Zeitpunkt der Medientnahme mikroskopisch überprüft. Die maximale Stimulation durch LPS fand sich bereits nach 24 Std. Danach war ein deutlicher Abfall zu verzeichnen, der, wie die parallele Beobachtung unter dem Mikroskop zeigte, im wesentlichen auf eine Überstimulation der Zellen mit nachfolgendem Absterben der Zellen durch die hohe LPS Konzentration zurückzuführen ist. Nach Gabe von anti-CD 40 Antikörper wurde eine kontinuierliche Zunahme der IL-6 Sekretion beobachtet. In der mikroskopischen Beurteilung fanden sich ab dem Tag 3-4 große

Zellhaufen mit Zellen, die lange dendritische Ausläufer im Sinne einer deutlichen Stimulation der Zellreifung aufwiesen.

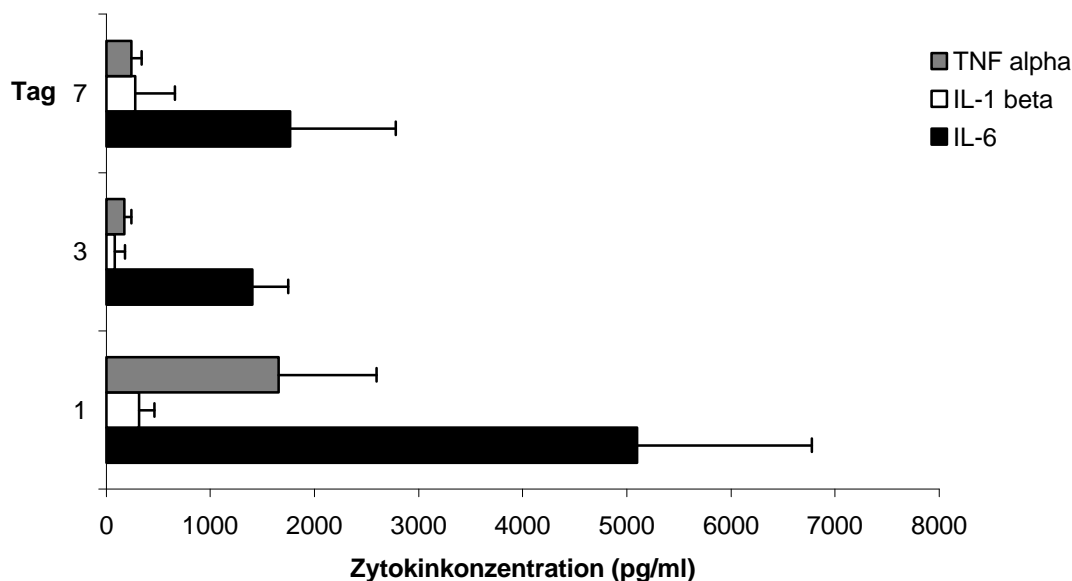


Abbildung 3.24: Darstellung der Sekretion der Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6 der NOD-DC-1 Zellen nach Stimulation mit 1000 ng/ml LPS über 24 Std., 3 und 7 Tage. Es wurden jeweils mindestens drei unabhängige Versuche analysiert.

Tabelle 3.3: Konzentrationen sezernierter Zytokine nach Stimulation mit 1000 ng / ml LPS über 24 Std., 3 und 7 Tagen, Angabe in pg/ml; in Klammern Angabe der SEM

	Zytokinkonzentration (pg/ml)		
	Nach 24 Std.	Nach 3 Tagen	Nach 7 Tagen
TNF α	1659 ± 937	172 ± 70	244 ± 93
IL-1 β	313 ± 152	82 ± 97	280 ± 377
IL-6	5097 ± 1683	1406 ± 345	1766 ± 1016

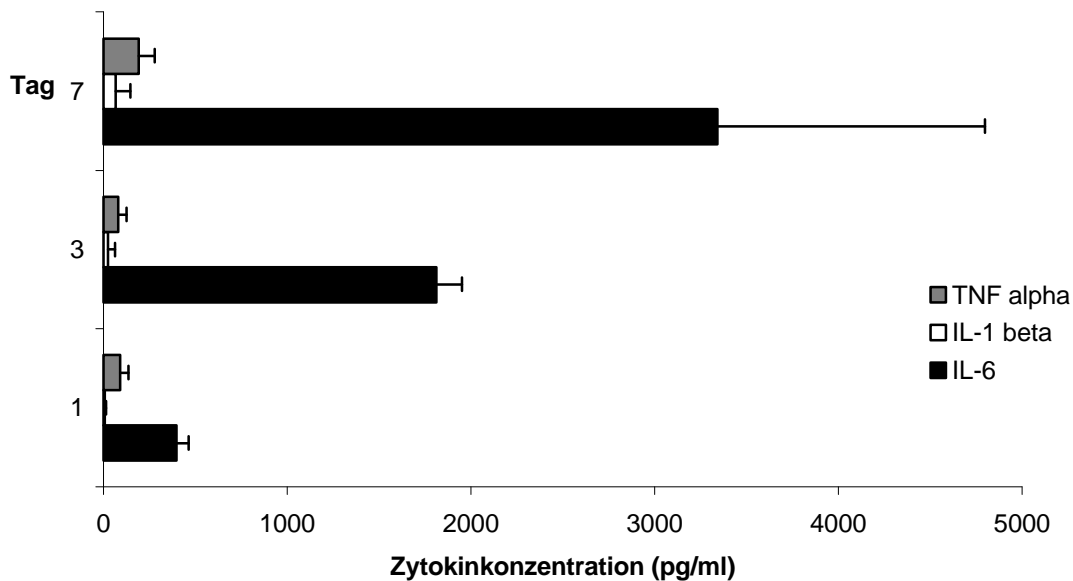


Abbildung 3.25: Darstellung der Sekretion der Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6 der NOD-DC-1 nach Stimulation mit 0,25 $\mu\text{g} / \text{ml}$ anti-CD 40 Antikörper über 24 Std., 3 und 7 Tage. Es wurden jeweils mindestens drei unabhängige Versuche analysiert.

Tabelle 3.4: Konzentrationen sezernierter Zytokine nach Stimulation mit 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-CD 40 Antikörper über 24 Std., 3 und 7 Tagen, Angabe in pg / ml ; in Klammern Angabe der SEM.

	Zytokinkonzentration (pg/ml)		
	Nach 24 Std.	Nach 3 Tagen	Nach 7 Tagen
TNF α	91 \pm 45	82 \pm 44	194 \pm 85
IL-1 β	8 \pm 4	26 \pm 37	68 \pm 80
IL-6	397 \pm 65	1812 \pm 141	3341 \pm 1456

3.7 Durchführung einer gemischten Leukozytenreaktion

Dendritische Zellen gehören zu der Gruppe der antigenpräsentierenden Zellen (APC). Um die Fähigkeit der Induktion einer gemischten Leukozytenreaktion zu untersuchen, wurden die NOD DC1 Zellen mit allogenen Lymphozyten der C57BL/6 Maus kultiviert.

Im ersten Schritt mussten die T-Lymphozyten aus einer Splenozytensuspension über eine negative Separation mit CD3 Isolierungssäulen isoliert werden. Aus einer Milz konnten durchschnittlich 15×10^6 Lymphozyten gewonnen werden. Die Zellen wurden im Anschluss unter dem Mikroskop und durch FACS begutachtet. Dadurch konnte die Vitalität und die Reinheit der Zellsuspension ermittelt werden. Ein repräsentatives Ergebnis ist in Abbildung 3.26 dargestellt. Durchschnittlich wurden über 80 % CD 3-positive Lymphozyten detektiert.

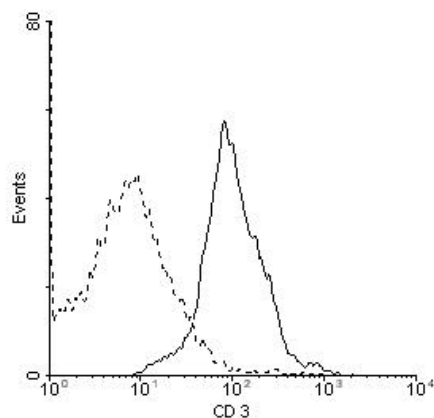


Abbildung 3.26: Repräsentative Darstellung einer durchflusszytometrischen Analyse von isolierten murinen T-Lymphozyten. In unterbrochener Linie ist die Isotypkontrolle dargestellt.

Für die Durchführung der Versuche wurden die NOD-DC1 Zellen geerntet und mit 3000 rad bestrahlt. Dies war von besonderer Wichtigkeit, um eine Proliferation der dendritischen Zellen zu vermeiden. Anschließend wurden die Zellen in unterschiedlicher Konzentration mit 2×10^5 gereinigten T-Lymphozyten für 3 Tage inkubiert und für die letzten 18 Stunden mit [3 H]-Thymidin radioaktiv markiert.

Das in Abbildung 3.27 dargestellte Ergebnis dieses Versuches macht deutlich, dass die eingesetzten NOD-DC1 Zellen eine von der DC / T-Zell Ratio abhängigen Proliferation der zugesetzten T-Lymphozyten induzieren.

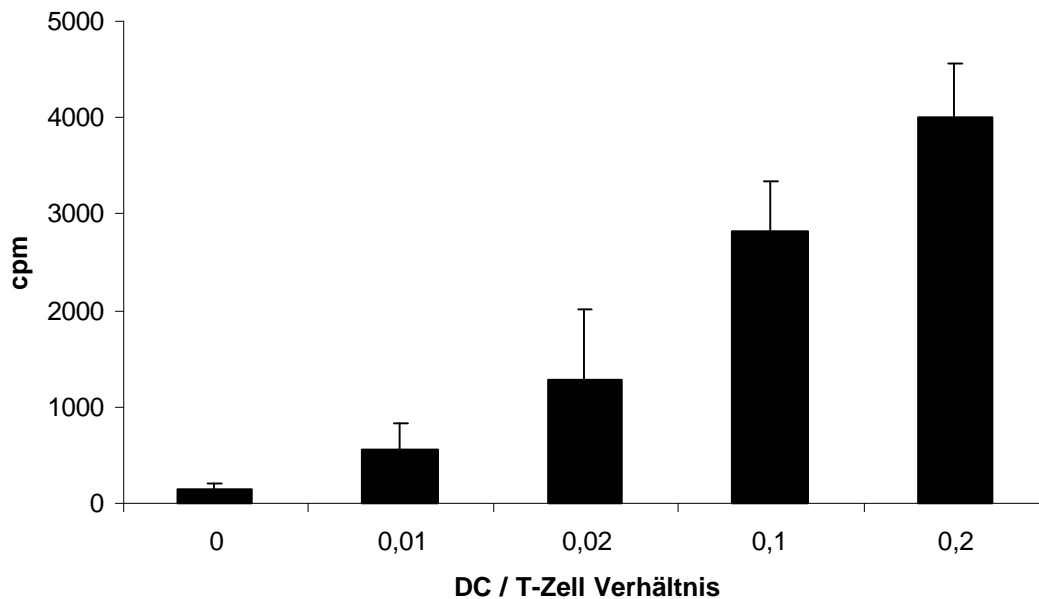


Abbildung 3.27: Induktion einer Alloreaktivität durch NOD-DC1 Zellen durch Kokultur mit T-Lymphozyten der C57BL/6 Maus. Kultiviert wurden 2×10^5 T-Zellen mit 2000, 4000, 20000 und 40000 NOD-DC1 Zellen für 3 Tage. Dargestellt ist die Proliferation der T-Lymphozyten gemessen in cpm des inkorporierten [^3H]-Thymidins.

Tabelle 3.5: Darstellung der Mittelwerte der cpm des inkorporierten [^3H]-Thymidins in Abhängigkeit des jeweiligen DC/T-Zell Verhältnisses; in Klammern Angabe der SEM

	DC/T-Zell Verhältnis				
	0	0,01	0,02	0,1	0,2
cpm	146 ± 66	553 ± 282	1289 ± 728	2824 ± 508	4008 ± 565

3.8 Untersuchung der Zytokinantwort der Lymphozyten nach MLR

Die Zytokinproduktion von T-Lymphozyten lässt Rückschlüsse auf die Induktion einer proinflammatorischen Reaktion (Th1-Immuntantwort: $\text{IFN}\gamma$, IL-2) oder einer antiinflammatorischen Immunantwort (Th2-Antwort: IL-4, IL-10, IL-13) zu. Zur Differenzierung der T-Zell Reaktion in der gemischten Lymphozytenreaktion wurden die T-Zellen nach 3 Tagen Inkubation mit NOD-DC1 Zellen oder BMDC Zellen unspezifisch mit PMA und Ionomycin stimuliert und die Zytokinsekretion mit Brefeldin A inhibiert. Auf diese Weise wird die Zytokinproduktion so gesteigert, dass sie durch eine intrazytoplasmatische

FACS Analyse detektiert werden kann. Die T-Zellen wurden zur Identifizierung mit einem PE-markierten anti-CD 3 Antikörper und FITC-markierten Antikörpern gegen IFN- γ oder IL-4 markiert.

Aus Abbildung 3.28 wird ersichtlich, dass nach dreitägiger Inkubation das Verhältnis zwischen den IFN- γ und IL-4 produzierenden Zellen im Vergleich zu den frisch isolierten Zellen abnimmt. Diese Reaktion war sowohl nach Stimulation mit BMDC als auch mit den NOD-DC1 Zellen zu verzeichnen und dürfte auf die Zellkulturbedingungen zurückzuführen sein. Das Resultat verdeutlicht, dass die NOD-DC1 Zellen auch in der MLR den frisch aus Knochenmark präparierten dendritischen Zellen vergleichbar ist.

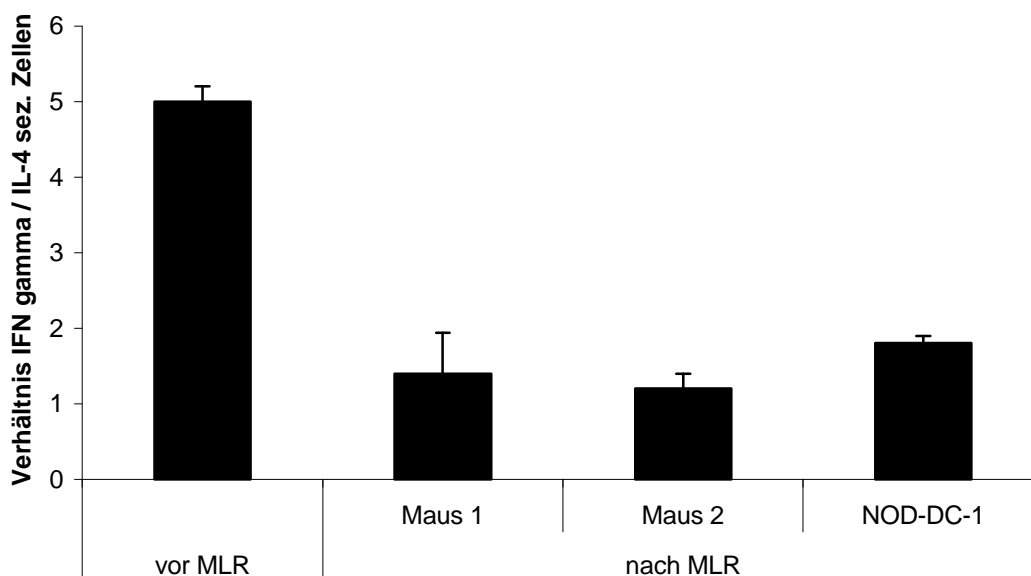


Abbildung 3.28: Darstellung des Verhältnisses IFN γ sezernierender zu IL-4 sezernierender Zellen vor und 3 Tage nach Zugabe von DC (entspricht vor und nach MLR). Die DC entstammten zweier unabhängiger Knochenmarkspräparationen (Maus 1 und 2) sowie der entwickelten Zelllinie (DC-Linie).

Vor MLR betrug das Verhältnis IFN γ sezernierender zu IL-4 sezernierender T-Zellen im Mittel $5,0 \pm 0,2$ ($n = 2$). Nach Zugabe von DC's zweier unabhängiger Knochenmarkspräparationen (Maus 1 und 2) und dreitägiger Kokultur änderte sich dieses Verhältnis der gleichen T-Zellen auf $1,4 \pm 0,54$ beziehungsweise $1,2 \pm 0,2$ und auf $1,8 \pm 0,1$ nach Zugabe der entwickelten Zelllinie NOD-DC1. Es wurden jeweils drei Ansätze analysiert.

4. Diskussion

Dendritische Zellen sind nach heutigem Wissensstand die Antigen-präsentierenden Zellen mit der höchsten Potenz zur Induktion einer zellulären Immunantwort. Da dendritische Zellen die zelluläre Immunreaktion durch Stimulation bzw. Suppression von T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen aktiv regulieren, stehen sie im Zentrum aktueller Forschungen zur Pathogenese und Therapie immunologisch ausgelöster Krankheiten. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein permanente Zelllinie von dendritischen Zellen herzustellen, die als Ausgangsmaterial für die Entwicklung einer DC-Vakzine dienen könnte. Durch kontinuierliche Subkultivierung einer Population von Milzzellen ist es in der vorliegenden Studie erstmals gelungen, eine permanente Zelllinie aus der NOD-Maus zu generieren, die sowohl phänotypisch wie auch funktionell typische Eigenschaften von dendritischen Zellen aufweist. Diese Zelllinie eignet sich somit in idealer Weise als homogene Quelle von gut charakterisierten dendritischen Zellen zur Testung verschiedener Immunisierungsstrategien für die Modulation der Autoimmunantwort bei der NOD Maus.

Als gängige Methoden für die Isolierung von murinen dendritischen Zellen dürfen die Protokolle betrachtet werden, die sich einer Dichtegradientenzentrifugation bedienen (Vremec et al., 1992) sowie solche, die die Anzucht aus murinem Knochenmark beinhalten (Inaba et al., 1992a). Beide Präparationsmethoden bedienen sich der Zugabe von GM-CSF und IL-4 als nötige Wachstumsfaktoren. Nach einer Dauer von 8-10 Tagen stehen reife Zellen für die Experimente zur Verfügung. Eine Kultivierung über diesen Zeitraum hinaus führt jedoch zum Absterben der Zellen. Für die vorliegende Arbeit wurde deshalb eine von Winzler und Mitarbeitern 1997 beschriebene Methode eingesetzt, dendritische Zellen ohne einen Transformationsschritt als permanente Langzeitkultur anzuzüchten (Winzler et al. 1997). Nach etwa 3 Monaten waren Verunreinigungen, soweit in der Phasenkontrastmikroskopie beurteilbar, weitgehend entfernt. Nach 6 Monaten war eine homogene Zelllinie etabliert, die als NOD-DC1 Zellen bezeichnet wurde. Diese Zellen wurden seitdem über mehr als 2 Jahre (> 50 Passagen) in gleichbleibender Qualität kultiviert. Es ist anzunehmen, dass unter den beschriebenen Bedingungen bisher nicht charakterisierte adulte Stammzellen aus der Milz anwachsen, aus denen sich fortlaufend dendritische Zellen ausbilden. Die Zellen zeigen ähnlich wie von Winzler et al. beschrieben einen stabilen Phänotyp und sind streng von dem Vorhandensein sowohl von GM-CSF als auch des NIH/3T3-Überstandes abhängig. In einer anderen Arbeit war über die Herstellung einer Zelllinie aus Langerhans Zellen der Haut

berichtet worden. In diesem Ansatz wurde ebenfalls neben GM-CSF NIH/3T3-Überstand verwendet (Xu et al., 1995b). Der Zellkulturüberstand der NIH/3T3 Zellen scheint somit einen oder mehrere bisher nicht genau definierte Faktoren zu beinhalten, die essentiell sind für das Anwachsen und/oder die Proliferation der Stammzellen bzw. notwendige Differenzierungsfaktoren für die dendritischen Zellen darstellen. Die Charakterisierung des/der Faktor(en) soll in zukünftigen Studien erfolgen.

Eine hohe Reinheit an dendritischen Zellen ist eine Voraussetzung für das weitere Arbeiten mit der Zelllinie NOD-DC1. Charakteristische Oberflächenmarker dendritischer Zellen, von T- und B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und hämatopoetischen Stammzellen dienten deshalb sowohl zur phänotypischen Charakterisierung der Zelllinie als auch zum Ausschluss von kontaminierenden anderen Zellen des Immunsystems. In FACS Analysen konnten die für dendritische Zellen charakteristische Kombination der Oberflächenmarker CD 11c, DEC-205, CD 80, CD 86 und MHC II nachgewiesen werden (Grabbe 2000; Ardavin 2001). Die nur teilweise Positivität DC-assoziiierter Marker (53-67%) läßt sich am ehesten auf das Nebeneinander von Zellen in verschiedenen Differenzierungsstadien, ausgehend von der Stammzelle bis zur voll ausgereiften dendritischen Zelle, zurückführen. Die Koexpression von CD 11c und CD 11b bei Fehlen von CD 8 α spricht für die Entwicklung der dendritischen Zellen aus der myeloischen Zellreihe und gegen eine Abstammung aus lymphatischen Stammzellen (Vremec und Shortman, 1997; Kraal et al., 1986, Grabbe 2000, Ardavin 2001). Die NOD-DC1 Zellen unterschieden sich von dendritischen Zellen, die aus dem Thymus oder der Leber gewonnen wurden. Thymus-DC's exprimieren kein oder wenig CD 11b (Vremec und Shortman, 1997), was aber auf Zellen der Zelllinie eindeutig detektiert werden konnte. Subpopulationen dendritischer Zellen der Leber scheinen nicht den charakteristischen Oberflächenmarker CD 11c zu exprimieren (Woo et al., 1994). Bei einer Subpopulation dendritischer Zellen, die aus Monozyten des peripheren Blutes der Maus gewonnen wurden, wurde das Fehlen des Markers DEC-205 (NLDC-145) beschrieben (Inaba et al., 1992b). Andere Studien konnten DEC-205 auf DC, die aus Monozyten generiert worden waren, nachweisen (Schreurs et al., 1999). Die hier von uns generierten NOD-DC1 Zellen zeigen somit Marker, die in anderen Studien auf myeloischen dendritische Zellen aus der Milz oder dem Knochenmark von Mäusen beschrieben worden waren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass keine Lymphozyten, Monozyten, CD 34-positiven Stammzellen oder Makrophagen kokultiviert wurden. Die geringgradige Detektion von CD 4, CD 8, CD 14, CD 19, und CD 34 (1-6%) ist am ehesten auf eine unspezifische Hintergrundfärbung im

FACS zurückzuführen. Insbesondere war es wichtig die Abwesenheit von Makrophagen zu beweisen, da diese Zellen Eigenschaften von APC aufweisen und, wie im Falle der Monozyten gezeigt werden konnte, sich aus den gleichen Vorläuferzellen entwickeln können (Allavena et al., 1998, Cella, et al., 1997). Hier ist der fehlende Nachweis des für Makrophagen charakteristischen Oberflächenmoleküls F 4/80 auf den Zellen der Linie NOD-DC1 wegweisend. In einem Ausreifungsversuch, bei dem GM-CSF durch M-CSF ersetzt worden ist, konnte kein Auftreten von F 4/80 positiven Zellen beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen der Kultur soweit differenziert sind, dass eine Entwicklung in Richtung Makrophagen nicht mehr möglich ist oder eine spezifischen Vorläuferzelle der dendritischen Zellen kultiviert wird. Diese postulierte Fraktion von Vorläuferzellen ließ sich allerdings weder mit einem spezifischen Marker eindeutig darstellen noch in der Gesamtpopulation im FSC/SSC-Diagramm abgrenzen.

Der Nachweis der intakten Funktion der dendritischen Zellen in der Langzeitkultur ist ein besonders wichtiger Aspekt, da er darüber entscheidet, ob diese Zelllinie für weitere Experimente *in vitro* und eventuell *in vivo* genutzt werden kann. Zu den wichtigsten Funktionen von dendritischen Zellen zählen die Aufnahme, die Prozessierung und die Präsentation von Antigenen auf MHC Molekülen. Daneben beeinflusst die Expression kostimulierender Moleküle und die Zytokinsekretion die Interaktion mit Effektorzellen des Immunsystems (Jonuleit et al., 2001, Moser et al., 2000).

Dendritische Zellen nehmen Antigene mittels Pinozytose und Phagozytose auf, wobei gelöste Bestandteile via Pinozytose, feste Partikel via Phagozytose inkorporiert werden. Zur Demonstration der Pinozytose wurde FITC-markiertes Albumin verwendet, das zeitabhängig von den dendritischen Zellen aufgenommen wurde. Hier konnten eindrucksvolle Ergebnisse erzielt werden: Nach 60 Minuten Inkubation hatten knapp 90% der Zellen FITC-Albumin aufgenommen. Diese hohe Aktivität der Aufnahme gelösten Antigens könnte auf die Expression des DC-Markers DEC-205 zurückzuführen sein. Neuere Studien belegen, dass DEC-205 als Rezeptor dient und direkt in die Antigenaufnahme (Pinozytose) involviert ist (Jiang et al., 1995). Eine hohe Phagozytoseaktivität konnte durch die Aufnahme von Goldpartikeln und FITC-markierten Latex Beads demonstriert werden. In beiden Experimenten belegt die fehlende FITC-Färbung bei 4°C die Abhängigkeit der Antigenaufnahme vom Zellstoffwechsel und die Spezifität der Reaktion. Vergleichbare Ergebnisse wurden bei Verwendung von murinen und humanen dendritischen Zellen aus dem Knochenmark oder dem peripheren Blut mit FITC-markiertem Dextran, Albumin oder Latex

Beads beschrieben (Sallusto et al. 1995, Vermaelen et al., 2001; Werling et al., 1999; Lutz et al., 1997). Sallusto und Kollegen beschrieben darüber hinaus die Aufnahme von FITC-Dextran als eine vom Mannoserezeptor vermittelte Aufnahme. Diese unterstützt die Makropinozytose, indem sie eine verstärkte Anreicherung von gelösten Substanzen niedriger Konzentration ermöglicht. Ob der Mechanismus der Aufnahme von FITC-Albumin ebenfalls rezeptorvermittelt ist, ist zur Zeit noch nicht geklärt.

Ein weiteres wichtiges Kriterium für den Nachweis einer adäquaten Funktion der DC's waren durchflusszytometrische Analysen der kostimulierenden Moleküle CD 40, CD 80 und CD 86 sowie des MHC-II Moleküls I-A^k. Das Vorhandensein der kostimulierenden Moleküle zeigt deutlich, dass die generierten dendritischen Zellen die Fähigkeit besitzen, über die Ligation von B-7 Molekülen und des CD 40 Liganden T-Lymphozyten zu aktivieren. Die hier beschriebene Prävalenz CD 40-, CD 80- und CD 86-positiver NOD-DC1 Zellen und die mittlere Fluoreszenzaktivität ist vergleichbar mit primär isolierten dendritischen Zellen des Knochenmarks und der Milz (Inaba et al., 1992a, Lutz et al., 1999). Der Nachweis von I-A^k beweist die Expression des spezifischen auf NOD-Zellen exprimierten MHC Klasse II Moleküls. I-A^k war aber im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Expressionsraten bei Balb/c oder C57/Bl6 Mäusen nur mittelgradig exprimiert (Schreurs et al., 1999, del Hoyo et al., 2002). Dies könnte auf eine nur teilweise erfolgte Ausreifung der NOD-DC1 Zellen zurückzuführen sein. In Versuchen, in denen die Zellen durch Zugabe von TNF- α oder LPS stimuliert wurden, konnte nur eine geringe Erhöhung der Expression von I-A^k sowie von CD 40, CD 80 und CD 86 beobachtet werden. Wichtig war, dass im direkten Vergleich der MHC II Moleküle auf den NOD-DC1 Zellen und primären BMDC der NOD Maus ähnliche Signalintensitäten nachweisbar waren. Dies lässt den Schluss zu, dass die NOD-DC1 Zellen, wie in anderen Studien bei der NOD Maus beschrieben, das MHC-Molekül I-A^k nur mittelgradig exprimieren (Lee et al., 2000, Strid et al., 2001). Die NOD-DC-1 Zellen weisen somit auch in diesem Marker ein den primären DC's der NOD-Maus vergleichbares Muster auf.

Dendritische Zellen zeigen eine stimulusabhängige Sekretion proinflammatorischer (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12) oder anti-inflammatorischer (IL-10) Zytokine. Reize, die eine Infektion mit Bakterien oder Viren anzeigen wie z.B. LPS oder Aktivierungssignale von T-Lymphozyten (Ligation von CD 40) führen zu einer Sekretion proinflammatorischer Zytokine (Cella et al., 1996). Demgegenüber kann die Behandlung mit TGF- β zur Sekretion von IL-10 führen, welches die Aktivierung von T-Lymphozyten supprimiert (Mitra et al., 1995, Koch et

al., 1996, Steinbrink et al., 1997, Liu et al., 1998, Strobl et al., 1999). In der vorliegenden Studie wurde die Sekretion von TNF α , IL-1 β und IL-6 nach verschiedenen Stimuli mit LPS, anti-CD 40 und TNF α im Zellkulturüberstand mit einem ELISA-Verfahren bestimmt. IL-1 β und IL-6 werden auf einen Reiz wie zum Beispiel durch die Bindung von dem bakteriellen Zellwandbestandteil LPS an den entsprechenden Rezeptor CD 14 von antigenpräsentierenden Zellen ausgeschüttet. TNF α wird ebenfalls von DC's, Makrophagen, Monozyten und Lymphozyten infolge einer Infektion sezerniert.

Um eine Degradation der Zytokine zu vermeiden, wurden mehrmalige Einfrier- und Auftauzyklen sowie ein längeres Stehenlassen der aufgetauten Proben vermieden.

In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass dendritische Zellen aus dem Knochenmark, aus dem peripheren Blut, aus der Milz und die Langerhans'schen Zellen der Haut IL-6 sezernieren können (Sparwasser et al., 1998, Schreiber et al., 1992). IL-6 besitzt Bedeutung bei der Differenzierung von T-Zellen und Stimulierung von Plasmazellen zur der Produktion von Antikörpern (Akira et al., 1993; Cerutti et al., 1998). Neben der Stimulation von Effektorzellen scheinen die Zytokine auch einen autokrinen Effekt auszuüben. IL-6 hat einen Einfluss auf die Proliferation von Vorläufern dendritischer Zellen und erhöht die Antigenpräsentation via MHC Klasse II (Hacein-Bey et al., 2001; Epstein et al., 1991; Lyman und Jacobsen 1998; Berthier et al., 2000).

Ein zweites wichtiges Zytokin, das von DC's produziert werden kann, ist TNF α (Morelli et al., 2001; Zhou et al., 1995; Rescigno et al., 2000). Es ist ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin, das eine Rolle bei der generellen Infektabwehr spielt und eine Ausreifung von dendritischen Zellen (Verstärkung der Expression von CD 80, CD 86 und der MHC Klasse II Moleküle) bewirkt (Yamaguchi et al., 1997). Mäuse, denen das Gen zur Produktion von TNF α fehlt, erliegen früh verschiedensten Infektionen wie zum Beispiel hervorgerufen durch *Listeria monocytogenes* (Lehner et al., 2002, Eugster et al., 1996). Pathologische Korrelate sind das Ausbleiben einer organisierten Bildung von B-Follikeln in Lymphknoten und das Fehlen von folliculären dendritischen Zellen (FDC), die für die Generierung einer Immunantwort eine übergeordnete Rolle spielen (Pasparakis et al., 1996). Insbesondere bei der NOD-Maus sind infiltrierende Makrophagen und dendritische Zellen in den Inseln des Pankreas die Hauptproduzenten dieses Zytokins, das zusammen mit IL-1 β zur Produktion von Stickstoffmonoxid führt und direkt toxisch auf die Betazellen wirkt (Dahlén et al., 1998, Rabinovitch et al. 1998). Bei der hier generierten Linie NOD-DC1 wurde eine starke Sekretion von TNF α beobachtet. Die Verringerung der TNF α -Sekretion bei der höchsten LPS Konzentration (1000 ng/ml) ist am ehesten auf eine Überstimulation der Zellen

zurückzuführen, da hier ein Teil der Zellen abstirbt. Dies war mikroskopisch am Ablösen eines Teils der Zellen zu erkennen. Darüber hinaus ist beschrieben worden, dass nicht voll ausgereifte dendritische Zellen weitaus mehr TNF α produzieren als nach Ausreifung mit LPS oder anti-CD 40 Antikörpern (Morelli et al., 2001). Es ist somit denkbar, dass eine Stimulation mit 1000 ng/ml LPS die dendritischen Zellen so schnell und stark ausreifen ließ, dass die TNF α -Sekretion nach 24 Std. schon herunter reguliert worden ist.

Bei sehr starker Stimulation war auch eine Sekretion von IL-1 β zu verzeichnen. IL-1 β ist involviert in die Aktivierung von T-Lymphozyten und Antigen-präsentierenden Zellen wie Makrophagen und dendritische Zellen. Darüber hinaus besitzt es Bedeutung für die Initiierung der Migration von Langerhans` Zellen (Cumberbatch et al., 1997; Cumberbatch et al., 1998). Übereinstimmend mit verschiedenen Arbeiten wurde IL-1 β erst bei starker Stimulation mit LPS oder CD 40 produziert (Kitajima et al., 1995, Morelli et al., 2001; Schreiber et al., 1992; Cumberbatch et al., 1998; Xu et al., 1995a).

Vor einigen Jahren konnte die Bedeutung des Zytokins IL-1 β in Kontext zum Diabetes der NOD-Maus gebracht werden. Stassi und Kollegen beobachteten 1997, dass β -Zellen der Langerhans`schen Inseln im Pankreas auf eine Inkubation mit IL-1 β mit einer Expression von Fas-Molekülen reagierten. Aus dieser Fas-Expression resultierte nach Kontakt mit aktivierten T-Lymphozyten eine Zerstörung des Inselgewebes. Ein weiterer Stimulus zur Sekretion von IL-1 β ist andererseits eine Interaktion zwischen Fas und Fas-Ligand, der auf dendritischen Zellen exprimiert wird. Somit existiert eine Signalkaskade mit positivem Feedback, wobei unklar ist, was dessen auslösendes Moment ist. Chervonsky und Mitarbeiter zeigten 1997, dass Fas-Ligand exprimierende β -Zellen empfindlicher auf diabetogene T-Zellen reagieren (Chervonsky et al., 1997a). Dementsprechend traten bei NOD-Mäusen nach Transplantation von Bauchspeicheldrüsen mit Fas-Ligand exprimierenden β -Zellen akute Abstoßungsreaktionen auf (Allison et al., 1997). Die IL-1 β -Sekretion mag somit eine besondere Bedeutung bei dendritischen Zellen der NOD-Maus in Hinblick auf die Pathogenese des murinen Diabetes Typ 1 haben.

Ein weiteres wichtiges von dendritischen Zellen sezerniertes Zytokin ist IL-12, das als Heterodimer aus zwei Ketten, IL-12p40 und IL-12p35, aufgebaut ist. IL-12 aktiviert in seiner bioaktiven Form (IL-12p70) Th Zellen und fördert die Entwicklung einer Th1 Reaktion und einer zytotoxischen Immunreaktion, die vor allem für die Abwehr viraler und intrazellulär bakterieller Infektionen sowie bei der Bekämpfung von Tumoren Bedeutung besitzt (Huang et al., 2001; Shimizu et al., 2001; Maldonado-Lopez et al., 2001; Grufman et al., 2000;

Trinchieri 1995; Macatonia et al., 1995; Heufler et al., 1996). IL-12 wird ebenfalls nach Stimulation von DC's sezerniert (Jakob et al., 1999, Moser et al., 2000). In allen hier durchgeführten Stimulationsversuchen ließ sich allerdings keine signifikante Sekretion von IL-12p70 erkennen. Viele Ergebnisse lagen an der Detektionsgrenze des ELISA-Kits (23,4 pg/ml, Firma R&D) und können somit nicht quantitativ ausgewertet werden. In Studien mit den NOD-DC1 Zellen, die nach der Anfertigung der vorliegenden Promotionsarbeit durchgeführt worden sind, konnte bei sehr starker Stimulation (1000 ng/ml LPS) mit deutlich mehr Zellen (1×10^6 /ml), eine geringgradige IL12p70 Sekretion detektiert werden. In anderen Arbeiten wurde ebenfalls über eine geringe IL-12 Sekretion bei bestimmten Subpopulationen von dendritischen Zellen berichtet. So konnte bei myeloischen DC's, die dem Thymus oder dem Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT) der Maus entstammen, keine oder nur geringe IL-12 Produktion nachgewiesen werden (Martinon-Ego et al., 2001; Iwasaki et al., 2001). Andere Befunde zeigen, dass dendritische Zellen der NOD-Maus im Vergleich zu Mäusen vom Stamm C57/B6 funktionelle Defekte in der Stimulation von T-Zellen besitzen, deren Ursachen in niedrigerer Expression kostimulierender Moleküle und einer niedrigeren Sekretionsrate von IL-12p70 liegen (Lee et al., 2000; Feili-Hariri et al., 2001). O'Keeffe und Kollegen haben beobachtet, dass die Untergruppen dendritischer Zellen, die kein CD 8 α exprimieren, wie die dendritischen Zellen dieser Arbeit, signifikant weniger IL-12p70 sezernieren. Weitere Studien zeigen, dass unter bestimmten Umständen eine Stimulation mit LPS oder anti-CD40 Antikörper alleine nicht zu einer detektierbaren Sekretion von IL-12 führen. Lediglich eine gleichzeitige Anwendung dieser Stimulanzen führt zu einem Nachweis dieses Zytokins (Berthier et al., 2000; Snijders et al., 1998). Da es unser Anliegen ist, durch DC Vakzinierung bei der NOD-Maus eine Th2 Immunreaktion oder eine T Zell Anergie zu erzeugen, erscheint die geringe Potenz der NOD-DC1 Zellen zur IL-12 Produktion als sehr günstig. Ob diese Einschätzung richtig ist, muss in zukünftigen Experimenten geklärt werden.

Die Studien zur konzentrations- und zeitabhängigen Sekretion von IL-1 β , IL-6 und TNF α nach Stimulation mit LPS zeigen, dass die NOD-DC1 Zellen sich auch auf der Ebene der Zytokinproduktion und Sekretion ähnliche wie primär isolierte dendritische Zellen verhalten.

Viele Arbeitsgruppen haben sich mit der Möglichkeit der Hemmung der stimulierenden Eigenschaften der dendritischen Zellen befasst. Es konnte dabei beobachtet werden, dass das Zytokin IL-10 einen hemmenden Einfluss auf die von dendritischen Zellen initiierte Immunreaktion hat. Die Folgen sind eine geringere Aktivierung von Th1 Zellen und

zytotoxischen T-Zellen, was sich unter anderem in einer Suppression der Immunantwort gegen Tumore oder eine schwächere Antwort gegen Infektionserreger zeigt (de Vries 1995). In vitro konnte nachgewiesen werden, dass unter IL-10-Einfluss die Funktion zytotoxischer T-Lymphozyten in der allogenen Leukozytenreaktion gehemmt wird (Wang et al., 1994). Untersuchungen auf Zytokinebene zeigten, dass zum einen das für eine Th2-Antwort charakteristische Zytokin IL-4 verstärkt von T-Lymphozyten nach Aktivierung durch IL-10 behandelten dendritischen Zellen sezerniert wird (Liu et al., 1998). Zum anderen wird von IL-10 vorbehandelten dendritischen Zellen das Zytokin IL-12 vermindert produziert (Huang et al., 2001; de Smedt et al., 1997). Darüber hinaus wird unter IL-10 Einfluss die Aggregationsfähigkeit (Qin et al., 1997) und die Antigenpräsentation gehemmt (Faulkner et al., 2000; Beissert et al., 1995) und kostimulierende Oberflächenmarker werden vermindert exprimiert (Ozawa et al., 1996; Ding et al., 1993). Als intrazellulärer Mechanismus der Ligation des IL-10 Rezeptor konnte eine Erhöhung des zyklischen AMP-Spiegels identifiziert werden (Kambayashi et al., 2001).

Um die Reaktion der NOD-DC1 Zellen auf IL-10 zu überprüfen, wurde in der vorliegenden Studie die Modulation der Zytokinsekretion untersucht. Die Resultate nach Vorbehandlung mit IL-10 reihen sich gut in die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen ein. Durch eine deutliche Inhibierung der Zytokinsekretion wurde nachgewiesen, dass die NOD-DC1 Zellen in ihrer stimulatorischen Aktivität modulierbar sind. Die Zytokinsekretionen von IL-1 β , IL-6 und TNF α konnten sowohl nach LPS-Gabe wie auch unter Behandlung mit dem anti-CD40 Antikörper durch parallele IL-10 Behandlung deutlich reduziert werden. Dies ist insbesondere im Hinblick auf die geplanten Versuche zur Vakzinierung mit den NOD-DC-1 Zellen von besonderer Wichtigkeit und eröffnet eventuell die Möglichkeit der gezielten Induktion einer Th2-Reaktion.

Im Gegensatz zur Zytokinsekretion konnten weniger deutliche Effekte nach Stimulation mit LPS oder anti-CD40 auf die Expression von MHC II und kostimulierender Oberflächenmoleküle beobachtet werden. Die Gabe von LPS, TNF α oder anti-CD40 Antikörper führte nur zu einer geringen Hochregulation von CD 80, CD 86 und MHC II. Analog hierzu war nach Inkubation mit IL-10 keine signifikante Verringerung der Expression dieser Aktivierungsmarker zu beobachten. Der geringe Effekt auf die Oberflächenmoleküle könnte zum einen auf die NOD-DC1 Zellen selbst und zum anderen auf die Kinetik der Synthese und Degradation der Oberflächenmarker der NOD-DC1 Zellen zurückzuführen sein. Eine Reihe von Studien konnte zeigen, dass verschiedene Populationen von DC unterschiedlich auf IL-10 reagieren und der immunsuppressive Effekt von IL-10 unter

bestimmten Bedingungen weniger stark auf die Expression von MHC II und CD 86 als auf die Zytokinsekretion wirken kann (Hart et al., 1995).

Die gemischte Leukozytenreaktion (auch MLR, mixed leukocyte reaction) ist in vielen Publikationen als Maß für die Fähigkeit der APC verwendet worden, über die MHC Moleküle allogene T-Lymphozyten zu stimulieren (Lu et al., 1995; Metlay et al., 1989; Nussenzweig und Steinman 1980). In Übereinstimmung mit Arbeiten, die primär isolierte DC`s verwendet haben, konnte in den hier durchgeführten Experimenten eine hohe Stimulationsfähigkeit der NOD-DC1 Zellen anschaulich demonstriert werden. Die Analyse der von den T-Zellen produzierten Zytokinen in der MLR diente zum Vergleich der Linie NOD-DC1 mit konventionell gezüchteten DC`s aus dem Knochenmark. Weiterhin sollte geprüft werden, ob die dendritischen Zellen die T-Lymphozyten in einer MLR in Richtung einer Th1 (IFN γ) oder Th2 (IL-4) Reaktion lenken. Im direkten Vergleich der NOD-DC1 Zellen mit primär aus dem Knochenmark isolierten DC konnte kein signifikanter Unterschied in der IL-4 und IFN γ Sekretion beobachtet werden. Man kann bei der Interpretation der Ergebnisse aber auch die durchschnittliche IL-4 – Produktion der von IFN γ gegenüberstellen. Dabei fällt auf, dass vor MLR mehr IFN γ als IL-4 produziert wird, was einer Th1-Reaktion entspricht, wie sie beim Diabetes Typ 1 vorliegt. Nach Durchführung der MLR liegt das Verhältnis der IFN γ -Produktion zu IL-4-Produktion bei etwa 1, das heißt, es werden in etwa gleiche Mengen an IFN γ wie IL-4 produziert. Die Interpretation dieser Beobachtung ist mit den hier vorliegenden Ergebnissen schwierig. Die Verschiebung des Verhältnisses kann zum einen auf die Änderung der Immunantwort in Richtung einer Th2-Antwort deuten, wenngleich noch kein Überwiegen der IL-4-Produktion vorliegt. Eine Erklärung für diese Theorie ist die Beobachtung, dass dendritische Zellen IL-10 sezernieren können (Iwasaki et al., 2001). IL-10 ist nötig, eine Th2-Antwort zu generieren (Maldonado-Lopez et al., 2001). Über diesen Weg könnte eine Herunterregulation von IFN γ getriggert werden. Iwasaki und Mitarbeiter haben allerdings 1999 erkannt, dass DC`s der Milz kein IL-10 produzieren. Es müssen somit weitere Experimente hinsichtlich der IL-10-Produktion von DC`s der Zelllinie durchgeführt werden, um diese Möglichkeit der MLR-Reaktion zu klären.

4.1 Ausblick

Mit NOD-DC1 steht eine permanente Zelllinie zur Verfügung, mit der Versuche zur Immunisierung mit DC vereinfacht werden. Bislang ist keine Methode der DC-Vakzinierung beschrieben worden, mit der Antigen-spezifisch eine Diabetesprotektion erzielt werden konnte. In drei Studien war bisher eine Reduktion der Diabetesinzidenz bei NOD Mäusen nach Injektion von autologen DC beschrieben worden. In der ersten Arbeit wurde von der Arbeitsgruppe von Clare-Salzler die Entstehung eines Diabetes durch Injektion von unbehandelten dendritischen Zellen, die aus den regionalen pankreatischen Lymphknoten isoliert worden waren, verhindert beziehungsweise hinausgezögert (Clare-Salzer et al., 1992). Da DC aus der Milz oder dem Knochenmark keinen Effekt hatten, ist die Wirkung wahrscheinlich auf die Expression von Autoantigenen zurückzuführen, die nach Freisetzung aus den Pankreas diabetischer Mäuse von DC aufgenommen wurden und in den Lymphknoten den T-Zellen präsentiert werden. In anderen Arbeiten konnte schon der Transfer von DC, in Antigen-unspezifischer Weise, die Diabetesentwicklung bei NOD Mäusen reduzieren (Shinomiya et al., 1999, Feili-Hariri et al., 1999, Papaccio et al., 2000). Diese Resultate können vermutlich durch eine unspezifische Immunstimulation durch die Kultivierung mit FCS-haltigem Medium, die eine generelle Th2 Immunreaktion begünstigt, und auf diese Weise die Diabetesentwicklung reduziert, erklärt werden. Die oben genannten Studien belegen, dass die DC auch bei der NOD-Maus eine zentrale Rolle bei der Modulation der Immunreaktion spielen. Im Hinblick auf die Entwicklung einer DC-Vakzine beim Menschen ist es notwendig, eine möglichst Autoantigen-spezifische Immunisierung zu entwickeln. Für die Weiterentwicklung dieser Methode könnten die NOD-DC1 Zellen das ideale Werkzeug darstellen, da mit diesen Zellen ein homogenes Zellmaterial zur Verfügung steht, die Zellen eine hohe Antigenaufnahme zeigen und in ihrer stimulatorischen Aktivität modulierbar sind. So wäre es denkbar, die Zellen mit im Medium gelösten Autoantigenen, wie Insulin, GAD oder IA-2, zu beladen. Bei der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis (EAE) konnte mit dieser Strategie durch die Vakzinierung mit Myelin-basischem-Protein gepulsten DC die Entstehung einer EAE verhindert werden (Huang et al., 2000).

Als Alternative könnte die Antigenbeladung der dendritischen Zellen durch Transfektion mit cDNA, die für Antigene kodiert oder durch eine Transduktion mit adenoviralen Vektoren durchgeführt werden. Beide Strategien wurden im Tierversuch erfolgreich für die Immuntherapie von malignen Tumoren eingesetzt (Ribas et al., 1997; Wan et al., 1997;

Brossart et al., 1997; Kim et al., 2001). Weiterhin könnte die Antigenexpression mit der Expression von Th2 Zytokinen in den DC kombiniert werden, um den immunsuppressiven Effekt zu verstärken. Mehrere Arbeitsgruppen konnten im Tiermodell der Kollagen-induzierten Arthritis durch Gabe von mit IL-4-transduzierten DC erfolgreich die Krankheitsentwicklung hemmen oder bei manifester Erkrankung die Krankheitsaktivität reduzieren (Kim et al., 2001, Morita et al., 2001). Darüber konnte nach Transduktion von DC mit IL-10 die Transplantatabstoßung nach Hauttransplantation reduziert werden (Coates et al., 2001). Mit IL-10 transduzierte DC's exprimieren kein CD 80 und CD 86 und sezernieren nicht das proinflammatorisch wirkende Interleukin IL-12. Gleiches konnte bei Mäusen nach Nierentransplantation beobachtet werden (Gorczynski et al., 2000).

Die Verfügbarkeit einer permanenten, voll funktionell aktiven DC-Zelllinie der NOD-Maus bietet zahlreiche Vorteile hinsichtlich der Standardisierung der DC-Vakzinierung bei der NOD-Maus. Die Testung der Antigenbeladung, der Applikationsform, der notwendigen DC-Konzentration und -Zahl sowie der Möglichkeiten der DC-Transfektion/-Transduktion dürften hiermit wesentlich vereinfacht werden. Zur Beurteilung der Effektivität der DC-Immunisierung bei der NOD-Maus für die Antigen-spezifische Prävention des Diabetes müssen die momentan laufenden Studien bei NOD Mäusen abgewartet werden. Da bei der Immunisierung mit dendritischen Zellen bisher bei Tumorpatienten kaum Nebenwirkungen beobachtet worden sind (Steinman et al., 2001), könnte dieser Ansatz, bei positiven Befunden im Tierversuch, auch eine vielversprechende Alternative für Prävention der Diabetesentwicklung beim Menschen darstellen.

5. Literaturverzeichnis

1. Akira S., Taga T., Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 1993; 54: 1 – 78.
2. Allavena P., Piemonti L., Longoni D., Bernasconi S., Stoppacciaro A., Ruco L., Mantovani A. IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur J Immunol* 1998; 28: 359 – 369.
3. Allison J., Georgiou H.M., Strasser A., Vaux D.L. Transgenic expression of CD95 ligand on islet β cells induces a granulocytic infiltration but does not confer immune privilege upon islet allografts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3943 – 3947.
4. Anderson D.M., Maraskovsky E., Billingsley W.L., Dougall W.C., Tometsko M.E., Roux E.R., Teepe M.C., DuBose R.F., Cosman D., Galibert L. A homologue of TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997; 390: 175 – 179.
5. Ardavin C., Martinez del Hoyo G., Martin P., Anjuere F., Arias C. F., Marin A. R., Ruiz S., Parillas V., Hernandez H. Origin and differentiation of dendritic cells. *Immunology* 2001; 22: 691 – 700.
6. Atkinson M., McLaren N. The pathogenesis of insulin dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 1994; 331: 1428 – 1436 .
7. Bach JF. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocrine Rev* 1994; 15: 516 – 542.
8. Bach J.F., Garchon H.J., van Endert P. Genetics of human type 1 diabetes mellitus. *Curr Dir Autoimmun* 2001; 4: 1 – 30.
9. Baekkeskov S., Aanstood S.H.J., Christgau S., Reetz A., Solimena M., Cascalho M., Folli F., Richter-Olesen H., DeCamilli P. Identification of the 64k autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA synthesizing enzyme glutamate decarboxylase. *Nature* 1990, 347: 151 – 156.
10. Beissert S., Hosoi J., Grabbe S., Asahina A., Granstein R.D. IL-10 inhibits tumor antigen presentation by epidermal antigen-presenting cells. *J Immunol* 1995; 154: 1280 – 1286.
11. Bendelac A., Carnaud C., Boitard C., Bach J.F. Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement for both L3T4+ and Lyt-2+ T cells. *J Exp Med*, 1987; 166: 823 – 832.

12. Berthier R., Martinon-Ego C., Laharie A.M., Marche P.N. A two-step culture method starting with early growth factors permits enhanced production of functional dendritic cells from murine splenocytes. *J Immunol Meth* 2000; 239: 95 – 107.
13. Buckner J., Kwok W.W., Nepom G., Nepom G.T. Modulation of HLA-DQ binding properties by differences in class II dimer stability and pH-dependent peptide interactions. *J Immunol*, 1996; 157: 4940 – 4945.
14. Buelens C., Verhasselt V., De Groote D., Thielemans K., Goldman M., Willems F. Human dendritic cell responses to lipopolysaccharide and CD40 ligation are differentially regulated by IL-10. *Eur J Immunol* 1997; 27: 1848 – 1852.
15. Carrasco-Marin E., Shimizu J., Kanagawa O., Unanue E.R. The class II MHC I-Ag7 molecule from non-obese diabetic mice are poor peptide binders. *J Immunol*, 1996; 156: 450 – 458.
16. Carrasco-Marin E., Kanagawa O., Unanue E.R. Insights into the chemistry and biology of the I-A^{g7} class II molecule. *Res Immunol*, 1997; 148: 291 – 301.
17. Caux C., Massacrier C., Vanbervliet B., Dubois B., Van Kooten C., Durand I., Banchereau J. Activation of human dendritic cells through CD40 cross- linking. *J Exp Med* 1994; 180: 1263 – 1272.
18. Cella M., Scheidegger D., Palmer-Lehmann K., Lane P., Lanzavecchia A., Alber G. 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 – 752.
19. Cella M., Engering A., Pinet V., Pieters J., Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 1997; 388: 782 – 787.
20. Cerutti A., Zan H., Schaffer A., Bergsagel L., Harindranath N., Max E.E., Casali P. CD40 ligand and appropriate cytokines induce switching to IgG, IgA, and IgE and coordinated germinal center and plasmacytoid phenotypic differentiation in a human monoclonal IgM+IgD+ B cell line. *J Immunol*. 1998; 160: 2145 - 2157.
21. Chervonsky A.V., Wang Y., Wong F.S., Visintin I., Flavell R.A., Janeway C.A. jr., Matis L.A. The role of Fas in autoimmune diabetes. *Cell* 1997a; 89: 17 – 24.
22. Chervonsky A.V., Wong F.S., Visintin I., Wang Y., Matis L., Flavell R.A., Janeway C.A. Expression of Fas (CD95) by pancreatic β -cells contributes to pathogenesis of autoimmune diabetes. San Francisco AAAAI / AAI / CIS Joint Meeting CD-ROM, 1997b.

23. Chervonsky A.V. Apoptotic and effector pathways in autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 1999; 11: 684 – 688.
24. Cho H.I., Han H., Kim C.C., Kim T.G. Generation of cytotoxic T lymphocytes specific for human cytomegalovirus using dendritic cells in vitro. *J Immunother* 2001; 24: 242 – 249.
25. Christie M., Genovese S., Cassidy D. et al. Antibodies to islet 37 K antigen, but not to glutamate decarboxylase, discriminate rapid progression to IDDM in endocrine autoimmunity. *Diabetes* 1994, 43: 1254 – 1259.
26. Clare-Salzler M.J., Brooks J., Chai A., van Herle K., Anderson C. Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by dendritic cell transfer. *J Clin Invest* 1992; 90: 741 – 748.
27. Coates P.T., Krishnan R., Kireta S., Johnston J., Russ G.R. Human myeloid dendritic cells transduced with an adenoviral interleukin-10 gene construct inhibit human skin graft rejection in humanized NOD-scid chimeric mice. *Gene Ther* 2001; 8(16): 1224 - 1233.
28. Coyle A.J., Gutierrez-Ramos J.C. The expanding B7 subfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat Immunol* 2001; 2: 203 – 209.
29. Cumberbatch M., Dearman R.J., Kimber I. Interleukin 1 beta and the stimulation of Langerhans cell migration: comparisons with tumour necrosis factor alpha. *Arch Dermatol Res* 1997; 289(5): 277 – 284.
30. Cumberbatch M., Dearman R.J., Kimber I. Characteristics and regulation of the expression on interleukin 1 receptors by murine Langerhans cells and keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 1998; 290(12): 688 – 695.
31. Dahlén E., Dawe K., Ohlsson L., Hedlund G. Dendritic cells and macrophages are the first and major producers of TNF- α in pancreatic islets in the nonobese diabetic mouse. *J. Immunol.* 1998; 190: 3585 – 3593.
32. Davies J.L., Kawaguchi Y., Bennett S.T., Copeman J.B., Cordell H.J., Pritchard L.E., Reed P.W., Gough S.C., Jenkins S.C., Palmer S.M., et al. A genome-wide search for human type 1 susceptibility genes. *Nature* 1994; 371: 130 – 136.
33. de Smedt T., Van Mechelen M., De Becker G., Urbain J., Leo O., Moser M. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol* 1997; 27: 1229 – 1235.
34. de Vries J.E. Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin 10. *Ann Med* 1995; 27(5): 537 – 541.

35. del Hoyo G.M., Martin P., Arias C.F., Marin A.R., Ardavin C. CD8 α ⁺ dendritic cells originate from the CD8 α ⁻ dendritic cell subset by a maturation process involving CD8 α , DEC-205 and CD24 up-regulation. *Blood* 2002; 99: 999 – 1004.
36. Ding L., Linsley P.S., Huang L.Y., Germain R.N., Shevach E.M. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol* 1993; 151(3): 1224 – 1234.
37. Elias D., Marcus H., Reshef T., Ablamunits V., Cohen I.R. Induction of diabetes in standard mice by immunization to the p277 peptide of a 60kDa heat shock protein. *Eur J Immunol*, 1995; 25: 2851 – 2857 .
38. Elias D., Meilin A., Ablamunits V., Birk O.S., Carmi P., Könen-Waisman S., Cohen I.R. Hsp60 peptide therapy of NOD mouse diabetes induces a Th2 cytokine burst and down-regulates autoimmunity to various β -cell antigens. *Diabetes*, 1997; 46(5): 758 – 764.
39. Epstein S.P., Baer R.L., Belsito D.V. Effect of triggering epidermal F_C gamma receptors on the interleukin-2- and interleukin-6-induced upregulation of Ia antigen expression by murine epidermal Langerhans cells: the role of prostaglandins and cAMP. *J Invest Dermatol* 1991; 97(3): 461 – 472.
40. Eugster HP, Muller M, Karrer U, Car BD, Schnyder B, Eng VM, Woerly G, Le Hir M, di Padova F, Aguet M, Zinkernagel R, Bluethmann H, Ryffel B. Multiple immune abnormalities in tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha double-deficient mice. *Int Immunol* 1996; 8: 23 – 36.
41. Faulkner L., Buchan G., Baird M. Interleukin-10 does not affect phagocytosis of particulate antigen by bone marrow-derived dendritic cells but does impair antigen presentation. *Immunology* 2000; 99(4): 523 – 531.
42. Feili-Hariri M., Dong X., Alber S.M., Watkins S.C., Salter R.D., Morel P.A. Immunotherapy of NOD mice with bone-marrow derived dendritic cells. *Diabetes* 1999; 48: 2300 – 2308.
43. Feili-Hariri M., Morel P.A. Phenotypic and functional characteristics of BM-derived DC from NOD and non-diabetes-prone strains. *Clin Immunol* 2001; 98(1): 133 – 142.
44. Forster I., Lieberam I. Peripheral tolerance of CD4 T cells following local activation in adolenscent mice. *Eur J Immunol* 1996; 26: 3194 – 3202.
45. Foulis A.K., McGill M., Farquharson M.A., Hilton D.A. A search for evidence of viral infection in pancreases in newly diagnosed patients with IDDM. *Diabetologia* 1997; 40: 53 – 61.

46. Geissler M., Gesien A., Tokushige K., Wands J.R. Enhancement of cellular and humoral immune response to Hepatitis C Virus core protein using DNA-based vaccines augmented with cytokine-expressing plasmids. *J Immunol* 1997; 158: 1231 – 1237.
47. Gorczynski R.M., Bransom J., Cattral M., Huang X., Lei J., Xiaorong L., Min W.P., Wan Y., Gauldie J. Synergy in induction of increased renal allograft survival after portal vein infusion of dendritic cells transduced to express TGFbeta and IL-10, along with administration of CHO cells expressing the regulatory molecule OX-2. *Clin Immunol* 2000; 95(3): 182 – 189.
48. Grabbe S., Kämpgen E., Schuler G. Dendritic cells: multi-lineal and multi-functional. *Immunology* 2000; 21: 431 – 433.
49. Grufman P, Karre K. Innate and adaptive immunity to tumors: IL-12 is required for optimal responses. *Eur J Immunol* 2000 Apr;30(4):1088 – 1093.
50. Hacein-Bey S., Gross F., Nusbaum P., Hue C., Hamel Y., Fischer A., Cavazzana-Calvo M. Optimization of retroviral gene transfer protocol to maintain the lymphoid potential of progenitor cells. *Hum Gene Ther* 2001; 12(3): 291 – 301.
51. Hart P.H., Ahern M.J., Smith M.D., Finlay-Jones J.J. Comparison of the suppressive effects of interleukin-10 and interleukin-4 on synovial fluid macrophages and blood monocytes from patients with inflammatory arthritis. *Immunology* 1995; 84: 536 – 542.
52. Hattori M., Buse J.B., Jackson R.A., Glimcher L, Dorf M.E., Minami M., Makino S., Moriwaki K., Kuzuya H., Imura H., et al. The NOD mouse: recessive diabetogenic gene in the major histocompatibility complex. *Science*, 1986; 14, 231(4739): 733 – 735.
53. Heath W.R., Carbone F.R. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Anu Rev Immunol* 2001; 19: 47 – 64.
54. Heufler C., Koch F., Stanzl U., Topar G., Wysocka M., Trinchieri G., Enk A., Steinman R.M., Romani N., Schuler G. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper I development as well as interferon- γ production by T helper I cells. *Eur J Immunol* 1996; 26: 659 – 668.
55. Hsu F.J., Benike C., Fagnoni F., Liles T.M., Czerwinski D., Taidi B., Engleman E.G., Levy R. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nature med* 1996; 2: 52 – 58.
56. Huang Y.M., Yang J.S., Xu L.Y., Link H., Xiao B.G. Autoantigen-pulsed dendritic cells induce tolerance to experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in Lewis rats. *Clin Exp Immunol* 2000; 122: 437 – 444.

57. Huang L.Y., Reis e Sousa C., Itoh Y., Inman J., Scott D.E. IL-12 induction by a TH1-inducing adjuvant in vivo: dendritic cell subsets and regulation by IL-10. *J Immunol* 2001; 167(3): 1423 – 1430.
58. Inaba K., Inaba M., Romani N., Aya H., Deguchi M., Ikchara S., Muramatsu S., Steinmann R.M. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 1992a; 176: 1693 – 1702.
59. Inaba K., Steinman R.M., Witmer Pack M., Aya H., Inaba M., Sudo T., Wople S., Schuler G. Identification of Proliferating Dendritic Cell Precursors in Mouse Blood. *J Exp Med* 1992b; 175: 1157 – 1167.
60. Inaba K., Inaba M., Naito M., Steinman R.M. dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including *Bacillus Calmette-Guerin* organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens *in vivo*. *J Exp Med* 1993; 178: 479 – 488.
61. Ito A., Kanto T., Kuzushita N., Tatsumi T., Sugimoto Y., Miyagi T., Takehara T., Katayama K., Mochizuki K., Hiramatsu N., Kasahara A., Yoshiya I., Sasaki Y., Hori M., Hayashi N. Generation of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes from healthy individuals with peptide-pulsed dendritic cells. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 309 – 316.
62. Iwasaki A., Kelsall B.L. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce Interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med* 1999; 190(2): 229 – 239.
63. Iwasaki A., Kelsall B.L. Unique functions of CD11b+, CD8 alpha+, and double-negative Peyer's patch dendritic cells. *J Immunol* 2001; 166(8): 4884 – 4890.
64. Jacob C.O., Aiso S., Michie S.A., McDevitt H.O., Acha-Orbea H. Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by tumor necrosis factor (TNF); similarities between TNF-a and interleukin-1. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1990;87: 968 – 972.
65. Jakob T., Walker P.S., Krieg A.M., von Stebut E., Udey M.C., Vogel J.C. Bacterial DNA and CpG-containing oligodeoxynucleotides activate cutaneous dendritic cells and induce IL-12 production: implications for the augmentation of Th1 responses. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 118(2-4): 457 – 461.
66. Jansen A., Homo-Delarche F., Hooijkaas H., Leenen P.J., Dardenne M., Drexhage H.A. Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of insulinitis and beta-cell destruction in NOD mice. *Diabetes*, 1994; 43: 667 – 675.

67. Jiang W., Swiggard W.J., Heufler C., Peng M., Mirza A., Steinman R.M., Nussenzweig M.C. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 1995; 375(6527): 151 – 155.
68. Johansen B.H., Buus S., Vartdal F., Viken H., Eriksen J.A., Thorsby E., Sollid L.M. Binding of peptides to HLA-DQ molecules: peptide binding properties of the disease-associated HLA-DQ ($\alpha 1^*0501$, $\beta 1^*0201$) molecule. *Int Immunol*, 1996; 6: 453 – 461.
69. Jonuleit H., Schmitt E., Steinbrink K., Enk A.H. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Immunology* 2001, 22: 394 – 400.
70. Jung T., Schauer U., Heusser C., Neumann C., Rieger C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J. Immunol. Methods*. 1993; 159:197 – 207.
71. Kallan A.A., Duinkerken G., de Jong R., van den Elsen P., Hutton J.C., Martin S., Roep B.O., de Vries R.R. Th1-like cytokine production profile and individual specific alterations in TCRBV-gene usage of T cells from newly diagnosed type 1 diabetes patients after stimulation with beta-cell antigens. *J Autoimmun*. 1997; 10: 589 – 598.
72. Kallmann B.A., Lampeter E.F., Hanifi-Moghaddam P., Hawa M., Leslie R.D., Kolb H. Cytokine secretion patterns in twins discordant for Type I diabetes. *Diabetologia*. 1999; 42: 1080 – 1085.
73. Kambayashi T., Wallin R.P., Ljunggren H.G. cAMP-elevating agents suppress dendritic cell function. *J Leukoc Biol* 2001; 70(6): 903 – 910.
74. Kaprio J., Tuomilehto J., Koskenvuo M., Romanov K., Reunanen A., Eriksson J., Stengard J., Kesaniemi Y.A. Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland. *Diabetologia* 1992; 35: 1060 – 1067.
75. Katz J.D., Benoist C., Mathis D. T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes. *Science* 1995; 268: 1185 – 1188.
76. Kim S.H., Kim S. Evans C.H., Ghivizzani S.C., Oligino T., Robbins P.D. Effective treatment of established murine collagen-induced arthritis by systemic administration of dendritic cells genetically modified to express IL-4. *J Immunol* 2001; 166: 3499 – 3505.
77. Kitajima T., Ariizumi K., Mohamadazadeh M., Edelbaum D., Bergstresser P.R., Takashima A. T cell-dependent secretion of IL-1 beta by a dendritic cell line (XS52) derived from murine epidermis. *J Immunol* 1995; 155(8): 3794 – 3800.
78. Kolb H. Benign versus destructive insulinitis. *Diabetes Metab Rev*. 1997;13: 139 – 146.

79. Kraal G., Breel M., Janse M., Bruin G. Langerhans' cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *J Exp Med* 1986; 163: 981 – 997.
80. Kurts C., Kosaka H., Carbone F.R., Miller J.F.A.P., Heath W.R. Class I-restricted crosspresentation of exogenous self antigens lead to deletion of autoreactive CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 1996; 186: 239 – 245.
81. Kwok W.W., Domeier M.E., Raymond F.C., Byers P., Nepom G.T. Allele-specific motifs characterize HLA-DQ interactions with a diabetes-associated peptide derived from glutamic acid decarboxylase. *J Immunol*, 1996; 2171 – 2177.
82. Larsson M., Fonteneau J.F., Somersan S., Sanders C., Bickham K., Thomas E.K., Mahnke K., Bhardwaj N. Efficiency of crosspresentation of vaccinia virus-derived antigens by human dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001; 31: 3432 – 3442.
83. Larsson M., Wilkens D.T., Fonteneau J.F., Beadle T.J., Merritt M.J., Kost R.G., Haslett P.A., Cu-Uvin S., Bhardwaj N., Nixon D.F., Shacklett B.L. Amplification of low-frequency antiviral CD8 T cell responses using autologous dendritic cells. *AIDS* 2002; 16: 171 – 180.
84. Lee M., Kim A.Y., Kang Y. Defects in the differentiation and function of bone marrow-derived dendritic cells in non-obese diabetic mice. *J Korean Med Sci* 2000; 15(2): 217 – 223.
85. Lehner M.D, Schwoebel F., Kotlyarov A., Leist M., Gaestel M., Hartung T. Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2-deficient mice show increased susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 2002; 168: 4667 – 4673.
86. Liblau R.S., Singer S.M., McDevitt H.Q. Th1 and Th2 CD4⁺ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today*, 1995; 16: 34 – 38.
87. Liu Y.-J., Grouard G., de Bouteiller O., Banchereau J. Follicular dendritic cells and germinal centers. *Int Rev Cytology* 1996; 166 : 139 – 179.
88. Liu Y.-J., Xu J., de Bouteiller O., Parham C.L., Grouard G., Djossou O., de Saint-Vis B., Lebecque S., Banchereau J., Moore K.W. Follicular dendritic cells specifically express the long CR2/CD 21 isoform. *J Exp Med* 1997; 185: 165 – 170.
89. Liu L., Rich B.E., Inobe J., Chen W., Weiner H.L. Induction of Th2 cell differentiation in the primary immune response: dendritic cells isolated from adherent cell culture treated with IL-10 prime naive CD4⁺ T cells to secrete IL-4. *Int Immunol* 1998; 10(8): 1017 – 1026.

90. Livingstone A., Edwards C.T., Shizuru J.A., Fathman C.G. Genetic analysis of diabetes in the nonobese diabetic mouse. I. MHC and T cell receptor beta gene expression. *J Immunol* 1991; 15, 146(2): 529 – 534.
91. Lu L., Woo J., Rao A.S., Li Y., Watkins S.C., Qian S., Starzl T.E., Demetris A.J., Thomson A.W. Propagation of Dendritic Cell Progenitors from Normal Mouse Liver Using Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor and Their Maturation Development in the Presence of Type-1 Collagen. *J Exp Med* 1994; 179: 1823 – 1834.
92. Lu L., McCaslin D., Starzl T.E., Thomson A.W. Bone marrow-derived dendritic cell progenitors (NLDC 145+, MHC class II+, B7-1dim, B7-2-) induce alloantigen-specific hyporesponsiveness in murine T lymphocytes. *Transplantation* 1995; 60(12): 1539 – 1545.
93. Lu P., Wang Y.L., Linsley P.S. Regulation of self-tolerance by CD80/CD86 interactions. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 858 – 862.
94. Lutz M.B., Rovere P., Kleijmeer M.J., Rescigno M., Assmann C.U., Oorschot V.M., Geuze H.J., Trucy J., Demandolx D., Davoust J., Ricciardi-Castagnoli P. Intracellular routes and selective retention of antigens in mildly acidic cathepsin D/lysosome-associated membrane protein-1/MHC class II-positive vesicles in immature dendritic cells. *J Immunol.* 1997; 159(8): 3707 – 3716.
95. Lutz M.B., Kukutsch N., Ogilvie A.L.J., Rössner S., Koch F., Romani N., Schuler G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from bone marrow. *J Immunol Meth* 1999; 223: 77 – 92.
96. Lyman S.D., Jacobsen S.E.W. C-kit ligand and Flt-3 ligand: Stem/Progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* 1998; 91: 1101 – 1034.
97. Macatonia S.E., Hosken N.A., Litton M., Vieira P., Hsieh C.-S., Culpepper J.A., Wysocka M., Trinchieri G., Murphy K.M., O'Garra A. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4⁺ T cells. *J Immunol* 1995; 154: 5071 – 5079.
98. Mackay I.R., Rosen F.S. T-cell Function and Migration. *New Engl J Med* 2000; 343: 1020 – 1034.
99. Maldonado-Lopez R., Maliszewski C., Urbain J., Moser M. Cytokines regulate the capacity of CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells to prime Th1/Th2 cells in vivo. *J Immunol* 2001; 167(8): 4345 – 4350.

100. Martinon-Ego C., Berthier R., Cretin F., Collin V., Laharie A.M., Marche P.N. Murine dendritic cells derived from myeloid progenitors of the thymus are unable to produce bioactive IL-12p70. *J Immunol* 2001; 166(8): 5008 – 5017.
101. Matsumoto M., Fu Y.X., Molina H., Huang G., Kim J., Thomas D.A., Nahm M.H., Chaplin D.D. Distinct roles of lymphotoxin- α and type I TNF receptor in the establishment of follicular dendritic cells from non-bone marrow-derived cells. *J Exp Med* 1997; 186: 1997 – 2004.
102. Mayordomo J.I., Zorina T., Storkus W.J., Zitvogel L., Garcia-Prats M.D., DeLeo A.B., Lotze M.T. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nature Med* 1995; 1: 1297 – 1302.
103. McAuthor J.G., Raulet D.H. CD28-induced costimulation of T helper type 2 cells mediated by induction of responsiveness to interleukin 4. *J Exp Med*, 1993; 178: 1645 – 1653.
104. McCulloch D.K., Koerker D.J., Kahn S.E., Bonner-Weir S., Palmer J.P. Correlation of in vivo β -cell function tests with β -cell mass pancreatic insulin content in streptozotocin-administrated baboons. *Diabetes* 1991; 40: 673 – 679.
105. McLellan A.D., Starling G.C., Hart D.N.J. Isolation of blood dendritic cells by discontinuous Nycodenz gradient centrifugation. *J Immunol Meth* 1995; 184: 81 – 89.
106. Menges M., Rossner S., Voigtlander C., Schindler H., Kukutsch N.A., Bogdan C., Erb K., Schuler G., Lutz M.B. Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med* 2002; 195: 15 – 21.
107. Metlay J.P, Pure E., Steinman R.M. Distinct features of dendritic cells and anti-Ig activated B cells as stimulators of the primary mixed leukocyte reaction. *J Exp Med* 1989; 169(1): 239 – 254.
108. Miller G.C., Pollack M.S., Nell L.J., Thomas J.W. Insulin-specific human T cells. *J Immunol* 1987; 139: 3622 – 3629.
109. Moll H., Fuchs H., Blank C., Rollinghoff M. Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur J Immunol* 1993; 23: 1595 – 1601.
110. Morelli AE, Zahorchak AF, Larregina AT, Colvin BL, Logar AJ, Takayama T, Falo LD, Thomson AW. Cytokine production by mouse myeloid dendritic cells in relation to

- differentiation and terminal maturation induced by lipopolysaccharide or CD40 ligation. *Blood* 2001; 98(5): 1512 – 1523.
111. Morita Y., Yang J., Gupta R., Shimizu K., Shelden E.A., Endres J., Mule, McDonagh K.T., Fox D.A. Dendritic cells genetically engineered to express IL-4 inhibits murine collagen-induced arthritis. *J Clin Invest* 2001; 107: 1275 – 1284.
 112. Moser M., Murphy K.M. Dendritic cell regulation of T_H1-T_H2 development. *Nature Immunol* 2000; 1: 199 – 205.
 113. Muntoni S., Fonte M.T., Stoduto S., Marietti G., Bizzarri C., Crino A., Ciampalini P., Multari G., Suppa M.A., Matteoli M.C., Lucentini L., Sebastiani L.M., Visalli N., Pozzilli P., Boscherini B., Muntoni S. Incidence of insulin-dependent diabetes mellitus among Sardinian-heritage children born in Lazio region, Italy. *Lancet* 1997; 349: 160 – 162.
 114. Naquet P., Ellis J., Tibensky D., Kenshole A., Singh B., Hodges R., Delovitch T.L. T cell autoreactivity to insulin in diabetic and related non-diabetic individuals. *J Immunol*, 1988; 140: 2569 – 2578.
 115. Nestle F.O., Alijagic S., Gilliet M., Sun Y., Grabbe S., Dummer R., Burg G., Schadendorf D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor-lysate-pulsed dendritic cells. *Nature medicine* 1998; 4: 328 – 332.
 116. Nicholson L.B., Kuchroo V.K. Manipulation of the Th1/Th2 balance in autoimmune disease. *Curr Opin Immunol*. 1996; 8: 837 – 842.
 117. Nijman H. W., Kleijmeer M.J., Ossevoort M.A., Oorschot V.M., Vierboom M.P., van de Keur M., Kenemans P., Kast W.M., Geuze H.J., Melief C.J. Antigen capture and MHC class II compartments of freshly isolated and cultured human blood dendritic cells. *J Exp Med* 1995; 182: 163 – 174.
 118. Nussenzweig M.C., Steinman R.M. Contribution of dendritic cells to stimulation of the murine syngeneic mixed leukocyte reaction. *J Exp Med* 1980; 151(5): 1196 – 1212.
 119. Okada H., Tahara H., Shurin M.R., Attanucci J., Giezemann-Smits K., Fellows W.K., Lotze M.T., Chambers W.H., Bozik M.E. Bone marrow derived dendritic cells pulsed with a tumor-specific peptide elicit effective anti-tumor immunity against intracranial neoplasms. *Int J Cancer* 1998; 78: 196 – 201.
 120. Ozawa H., Aiba S., Nakagawa, Tagami H. Interferon-gamma and interleukin-10 inhibit antigen presentation by Langerhans cells for T helper type 1 cells by suppressing their CD80 (B7-1) expression. *Eur J Immunol* 1996; 26(3): 648 – 652.

121. Papaccio G., Nicoletti F., Pisanti F.A., Bendtzen K., Galdieri M. Prevention of spontaneous autoimmune diabetes in NOD mice by transferring in vitro antigen-pulsed syngeneic dendritic cells. *Endocrinology* 2000; 141: 1500 – 1505.
122. Pasparakis M., Alexopoulou L., Episkopou V., Kollias G. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J Exp Med* 1996; 184: 1397 – 1411.
123. Peterson J.D., Haskins K. Transfer of diabetes in the NOD-scid mouse by CD4 T-cell clones. Differential requirement for CD8 T-cells. *Diabetes*, 1996; 45: 328 – 336.
124. Pierre P., Mellman I. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 1997; 388: 787 – 792.
125. Prochazka M., Leiter E.H., Serreze D.V., Coleman D.L. Three recessive loci required for insulin-dependent diabetes in nonobese diabetic mice. *Science*, 1987; 17; 237 (4812): 286 – 289.
126. Prud'homme G.J. Gene therapy of autoimmune diseases with vectors encoding regulatory cytokines or inflammatory cytokine inhibitors. *J Gene Med* 2000; 2: 222 – 232.
127. Qin Z., Noffz G., Mohaupt M., Blankenstein T. Interleukin-10 prevents dendritic cell accumulation and vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-modified tumor cells. *J Immunol* 1997; 159(2): 770 – 776.
128. Rabinovitch A., Suarez-Pinzon W.L. Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol.* 1998; 55: 1139 – 1149.
129. Rapoport M.J., Lazurus A.H., Jaramillo A., Speck E., Delovitch T.L. Thymic T cell anergy in autoimmune nonobese diabetic mice is mediated by deficient T cell receptor regulation in the pathway of p21ras activation. *J Exp Med*, 1993; 177: 1221 – 1226.
130. Redondo M.J., Rewers M., Yu L., Garg S., Pilcher C.C., Elliott R.B., Eisenbarth G.S. Genetic determination of islet cell autoimmunity in monozygotic twin, dizygotic twin and non.twin siblings of patients with type 1 diabetes: Prospective twin study. *BMJ* 1999; 318: 698 – 702.
131. Reis e Sousa C., Stahl P.D., Austyn J.M. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J Exp Med* 1993; 178: 509 – 519.

132. Reizis B., Altmann D.M., Cohen I.R. Biochemical characterization of the human diabetes-associated HLA-DQ8 allelic product: similarity to the major histocompatibility complex class II I-A(g)7 protein of non-obese diabetic mice. *Eur J Immunol*, 1997; 27(10): 2478 – 2483.
133. Rescigno M., Piguet V., Valzasina B., Lens S., Zubler R., French L., Kindler V., Tschopp J., Ricciardi-Castagnoli P. Fas engagement induces the maturation of dendritic cells (DCs), the release of interleukin (IL)-1beta, and the production of interferon gamma in the absence of IL-12 during DC-T cell cognate interaction: a new role for Fas ligand in inflammatory responses. *J Exp Med* 2000; 192(11): 1661 – 1668.
134. Ribas A, Butterfield LH, McBride WH, Jilani SM, Bui LA, Vollmer CM, Lau R, Dissette VB, Hu B, Chen AY, Glaspy JA, Economou JS. Genetic immunization for the melanoma antigen MART-1/Melan-A using recombinant adenovirus-transduced murine dendritic cells. *Cancer Res* 1997; 57(14): 2865 – 2869.
135. Roep B.O. T-cell responses to autoantigens in IDDM. The search for the holy grail. *Diabetes*, 1996; 45: 1147 – 1156.
136. Roncarlo M.G., Levings M.K. The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity. *Curr Op Immunol* 2000; 12: 676 – 683.
137. Sallusto F., Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J Exp Med* 1994; 179: 1109 – 1118.
138. Sallusto F., Cella M., Danieli C., Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: Downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995; 182: 389 – 400.
139. Schattenberg D., Schott M., Reindl G., Krueger T., Tschoepe D., Feldkamp J., Scherbaum W.A., Seissler J. Response of human monocyte-derived dendritic cells to immunostimulatory DNA. *Eur J Immunol*. 2000 ;30(10): 2824 – 2831.
140. Schloot N.C., Willems S., Duinkerken G., de Vries R.R., Roep B.O. Cloned T cells from a recent onset IDDM patient reactive with insulin B-chain. *J Autoimmun*. 1998; 11: 169 – 175 .
141. Schott M., Feldkamp J., Schattenberg D., Krueger T., Dotzenrath C., Seissler J., Scherbaum W.A. Induction of cellular immunity in a parathyroid carcinoma treated with tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Eur J Endocrinol*. 2000; 142(3): 300 – 306.

142. Schranz D.B., Lernmark A. Immunology in diabetes: An update. *Diabetes Metab Rev* 1998; 14: 3 – 29.
143. Schreiber S., Kilgus O., Payer E., Kutil R., Elbe A., Mueller C., Stingl G. Cytokine pattern of Langerhans cells isolated from murine epidermal cell cultures. *J Immunol* 1992;149(11): 3524 – 3234.
144. Schreurs M.W.J., Eggert A.A.O., de Boer A.J., Figdor C.G., Adema G.J. Generation and functional characterization of mouse monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 1999; 29: 2835 – 2841.
145. Shimizu T., Berhanu A., Redlinger R.E. Jr, Watkins S., Lotze M.T., Barksdale E.M. Jr. Interleukin-12 transduced dendritic cells induce regression of established murine neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 2001; 36(8): 1285 – 1292.
146. Shinomiya M., Fazle Akbar S.M., Shinomiya H., Onji M. Transfer of dendritic cells (DC) ex vivo stimulated with interferon-gamma (IFN-gamma) down-modulates autoimmune diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice. *Clin Exp Immunol* 1999; 117: 38 – 43.
147. Snijders A., Kalinsky P., Hilkens C.M.U., Kapsenberg M.L. High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *Int Immunol* 1998; 10: 1593 – 1598.
148. Sparwasser T., Koch E.S., Vabulas R.M., Heeg K., Lipford G. B., Ellwart J. W., Wagner H. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol* 1998 ; 28 : 2045 – 2054.
149. Stassi G., De Maria R., Trucco G., Rudert W., Testi R., Galluzzo A., Giordano C., Trucco M. Nitric oxide primes pancreatic β cells for Fas-mediated destruction in insulin-dependant diabetes mellitus. *J Exp Med* 1997; 186: 1193 – 1200.
150. Steinman R., Dhodapkar M. Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future. *Int J Cancer* 2001; 94: 459 – 473.
151. Strid J., Lopes L., Marcinkiewicz L., Petrovska L., Nowak B., Chain B.M., Lund T. A defect in bone marrow derived dendritic cell maturation in the nonobesediabetic mouse. *Clin Exp Immunol* 2001; 123: 375 – 381.
152. Svensson M., Stockinger B., Wick M.J. Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. *J Immunol* 1997; 158: 4229 – 4236.

153. Szopa T.M., Titchener P.A., Portwood N.D., Taylor K.W. Diabetes mellitus due to viruses – some recent developments. *Diabetologia* 1993; 36: 687 – 695.
154. Taylor-Robinson A.W., Phillips R.S. Expression of IL-1 receptor discriminates Th2 from Th1 cloned CD4+ T cells specific for *Plasmodium chabaudi*. *Immunology*, 1994; 81: 216 –221.
155. Thurnher M., Papesh C., Ramoner R., Gastl G., Böck G., Radmayr C., Klocker H., Bartsch G. In vitro generation of CD 83+ human blood dendritic cells for active tumor immunotherapy. *Exp Hematol* 1997; 25: 232 – 237.
156. Tian J., Atkinson M.A., Clare-Salzler M., Herschenfeld A., Forsthuber T., Lehmann P.V., Kaufmann D.L. Nasal administration of glutamate decarboxylase (GAD65) peptides induces Th2 responses and prevents murine insulin-dependent diabetes. *J Exp Med*, 1996 ; 183 : 1561 – 1567.
157. Timmerman J.M., Levy R. Melanoma vaccines: Prim and proper presentation. *Nature medicine* 1998; 4: 296 – 270.
158. Tisch R, Yang XD, Singer SM, Liblau RS, Fugger L, McDevitt HO. Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice. *Nature*. 1993; 366: 72 – 75.
159. Tisch R., McDevitt H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 1996; 85: 291 – 297.
160. Tisch R., Liblau R.S., Yang X.-D., Liblau P., McDevitt H.O. Induction of GAD65-specific regulatory T-cells inhibits ongoing autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 1998; 47: 894 – 899.
161. Todd J.A. Genetic analysis of type 1 diabetes using whole genome approaches. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8560 – 8565.
162. Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 251 – 276.
163. Vermaelen K.Y., Carro-Muino I., Lambrecht B.N., Pauwels R.A. Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *J Exp Med*. 2001; 193(1): 51 – 60.
164. Vremec D., Zorbas M., Scollay R., Saunders D.J., Ardavin C.F., Wu L., Shortman K. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD 8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J Exp Med* 1992; 176: 47 – 57.

165. Vremec D., Shortman K. Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs. *J. Immunol.* 1997; 159: 565 – 573.
166. Wan Y, Bramson J, Carter R, Graham F, Gauldie J. Dendritic cells transduced with an adenoviral vector encoding a model tumor-associated antigen for tumor vaccination. *Hum Gene Ther* 1997; 8(11): 1355 – 1363.
167. Wang L., Goillot E., Tepper R.I. IL-10 inhibits alloreactive cytotoxic T lymphocyte generation in vivo. *Cell Immunol* 1994; 159(2): 152 – 169.
168. Wegmann D.R., Shehadeh N., Lafferty K.J., Norbury-Glaser M., Gill R.G., Daniel D. Establishment of islet-specific T-cell lines and clones from islet isografts placed in spontaneously diabetic NOD mice. *J Autoimmun*, 1993; 6: 517 – 527.
169. Wegmann D.R., Norbury-Glaser M., Daniel D. Insulin-specific T cells are a predominant component of islet infiltrates in pre-diabetic NOD mice. *Eur J Immunol*, 1994; 24: 1853 – 1857.
170. Werling D., Hope J.C., Chaplin P., Collins R.A., Taylor G., Howard C.J. Involvement of caveolae in the uptake of respiratory syncytial virus antigen by dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 1999; 66(1): 50 – 58.
171. Wicker L.S., Miller B.J., Mullen Y. Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes*, 1986; 35: 855 – 860.
172. Winzler C., Rovere P., Rescigno M., Granucci F., Penna G., Adorini L., Zimmermann V.S., Davoust J., Ricciardi-Castagnoli P. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J. Exp. Med.* 1997; 185: 317 – 328.
173. Wong B.R., Josien R., Lee S.Y., Sauter B., Li H.L., Steinman R.M., Choi Y. TRANCE, a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell specific survival factor. *J Exp Med* 1997; 186: 2075 – 2080.
174. Wong F.S., Visintin I., Wen L., Flavell R.A., Janeway C.A. CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells. *J Exp Med*, 1996; 183: 67 – 76.
175. Woo J, Lu L, Rao AS, Li Y, Subbotin V, Starzl TE, Thomson AW. Isolation, phenotype, and allostimulatory activity of mouse liver dendritic cells. *Transplantation* 1994; 58(4): 484 – 491.
176. Wu L., Vremec D., Ardavin C., Winkel K., Süß G., Georgiou G., Maraskovsky E., Cook W., Shortman K. Mouse thymus dendritic cells: kinetics of development and changes in surface markers during maturation. *Eur J Immunol* 1995; 25: 418 – 425.

177. Wu L., Li C.-L., Shortman K. Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *J Exp Med* 1996; 184: 903 – 911.
178. Xiao B.G., Huang Y.M., Yang J.S., Xu L.Y., Link H. Bone marrow- derived dendritic cells from experimental allergic encephalomyelitis induce immune tolerance to EAE in Lewis rats. *Clin Exp Immunol* 2001; 125: 300 – 309.
179. Xu S, Ariizumi K, Edelbaum D, Bergstresser PR, Takashima A. Cytokine-dependent regulation of growth and maturation in murine epidermal dendritic cell lines. *Eur J Immunol* 1995a; 25(4): 1018 – 1024.
180. Xu S., Ariizumoi K., Caceres-Dittmar G., Edelbaum D., Hashimoto K., Bergstresser P. R., Takashima A. Successive generation of antigen-presenting, Dendritic cell lines from murine epidermis. *J Immunol* 1995b; 154: 2697 – 2705.
181. Yamaguchi Y., Tsumura H., Miwa M., Inaba K. Contrasting effects of TGF- β 1 and TNF- α on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow. *Stem Cells* 1997; 15: 144 – 153.
182. Yoon J.W., Austin M., Onodera T., Notkins A.L. Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *N Engl J Med* 1979; 300: 1173 – 1179.
183. Zhou L.J., Tedder T.F. A distinct pattern of cytokine gene expression by human CD83+ blood dendritic cells. *Blood*. 1995; 86(9): 3295 – 3301.
184. Zitvogel L., Mayordomo J.I., Tjandrawan T., DeLeo A.B., Clarke M.R., Lotze M.T., Storkus W.J. Therapy of murine tumors with tumor peptide pulsed dendritic cells: Dependence on T-cells, B7 costimulation and Th1-associated cytokines. *J Exp Med* 1996; 183: 87 – 97.

6. Danksagung

Bei Herrn Priv. Doz. Dr. med. habil. Jochen Seissler bedanke ich mich sehr herzlich für die Betreuung dieser Promotionsarbeit, insbesondere für seine ständige Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion und für seine wegweisenden Ratschläge.

Für die Gelegenheit zur Realisierung der Doktorarbeit am Deutschen Diabetes Forschungsinstitut in Düsseldorf bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Werner Scherbaum.

Des weiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. med. Matthias Schott, Herrn Dirk Schattenberg, Herrn Dipl. biol. Gerald Reindl und Frau Dr. rer. nat. Barbara Schwippert für die fachliche Unterstützung und Beratung bei der praktischen Durchführung und Auswertung der Experimente.

Zu Dank für ihre Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Experimente im Deutschen Diabetes Forschungsinstitut bin ich Frau Melanie Klucken, Frau Barbara Schmitz, Frau Dipl. biol. Sandra Wagner, Frau Ulrike Wohlrab und Frau Cordula Wünsche verpflichtet, durch deren Einsatz die Promotionsarbeit erleichtert wurde.

Abschließend gilt mein besonderer Dank meinen Eltern Frau Ingrid Krüger und Herrn Dr. mont. Dipl. Ing. Gerhard Krüger, ohne deren moralische und wohlwollende Unterstützung die Durchführung der Promotion sowie des gesamten Medizinstudiums nicht möglich gewesen wären.

7. Lebenslauf

THILO KRÜGER

Kullenhofstrasse 22 • 52074 Aachen • Telefon (0241) 8941420

Geburtsdatum /-ort:
Nationalität:
Familienstand:

07.10.1974 in Wuppertal
deutsch
ledig

Schullaufbahn

- August 1981 bis Juli 1985
- August 1985 bis Juli 1994

Grundschule "Am Baum", Velbert
Geschwister-Scholl-Gymnasium, Velbert
Abschluss: Abitur

Wehrdienst

- Oktober 1994 bis Januar 1995
- Januar 1995 bis Oktober 1995

Grundausbildung zum Sanitätssoldat
Ausbildungs-Musikkorps der Bundeswehr

Studium

- Seit Oktober 1995
- September 1997
- September 1998
- April 2001
- Mai 2002

Studium der Medizin, Heinrich-Heine-Universität,
Düsseldorf
Physikum
1. Staatsexamen
2. Staatsexamen
3. Staatsexamen

Praktisches Jahr

- 24.04.2001 bis 10.08.2001
- 10.08.2001 bis 30.11.2001
- 01.12.2001 bis 24.03.2002

Innere Medizin, Abteilung Nephrologie / Hypertonie,
Inselspital, Bern, Schweiz
Chirurgie, Marienhospital, Düsseldorf
Anästhesie, Marienhospital, Düsseldorf

Berufliche Tätigkeit

- Seit 01.07.2003

Arzt im Praktikum, Innere Medizin II,
Universitätsklinikum der RWTH Aachen

Publikationen

- Schott M, Feldkamp J, Schattenberg D, Krueger T, Dotzenrath C, Seissler J, Scherbaum WA. Induction of cellular immunity in a parathyroid carcinoma treated with tumor lysate-pulsed dendritic cells. Eur J Endocrinol. 2000 Mar; 142 (3): 300-6.
- Schattenberg D, Schott M, Reindl G, Krueger T, Tschoepe D, Feldkamp J, Scherbaum WA, Seissler J. Response of human monocyte-derived dendritic cells to immunostimulatory DNA. Eur J Immunol. 2000 Oct; 30 (10): 2824-31.

8. Zusammenfassung

Die vorliegende Studie hatte zum Ziel, eine permanente Zelllinie dendritischer Zellen der NOD-Maus zu erzeugen, die für die Durchführung von Vakzinierungsversuchen geeignet ist.

Um dies zu erreichen, wurde dendritischen Zellen aus der Milz einer NOD-Maus isoliert und in IMDM-Medium mit GM-CSF und Mediumüberstand von 3T3-Fibroblasten als Wachstumsfaktor kultiviert. Durch kontinuierliche Passagen wurde eine homogene Zelllinie (NOD-DC1 Zellen) gewonnen, die anschließend durch FACS-Analysen, Proliferationsassays und Zytokinbestimmungen genau charakterisiert worden ist. In der durchflusszytometrischen Analyse zeigten die NOD-DC1 Zellen die für dendritische Zellen charakteristische Kombination von Oberflächenmarkern, insbesondere CD11c und DEC 205. Des Weiteren konnten die kostimulierenden Moleküle CD40, CD80 und CD86 sowie MHC Klasse II Moleküle nachgewiesen werden. Eine Kontamination mit Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen konnte ausgeschlossen werden. In der gemischten Leukozytenreaktion wurde eine konzentrationsabhängige Proliferation allogener T-Lymphozyten nachgewiesen. Weiterhin wurde die Fähigkeit zur Phagozytose und Pinozytose durch den Nachweis einer zeit- und temperaturabhängigen Aufnahme von FITC-markierten Albumin, FITC-markierten Latex-Beads und 1 µm messenden Goldpartikeln belegt. Die Sekretion von Zytokinen wurde nach Gabe von LPS und einem anti-CD40 Antikörper im ELISA untersucht. Hierbei konnte eine stimulusabhängige starke Sekretion von IL-6 und TNF α beobachtet werden. IL-1 β wurde nur in geringen Maße freigesetzt und die IL-12 Produktion lag unterhalb des Messbereiches. Wie bei primär isolierten dendritischen Zellen war die Zytokinsekretion der NOD-DC1 Zellen durch Vorinkubation mit IL-10 modulierbar.

In der vorliegenden Studie ist es erstmals gelungen eine permanente wachstumsfaktorabhängige Langzeitkultur dendritischer Zellen aus der NOD-Maus zu generieren. Diese Zellen besitzen charakteristische phänotypische und funktionelle Marker reifer dendritischer Zellen. Die NOD-DC1 Zellen können somit in Zukunft für die Entwicklung von DC-Vakzinen verwendet werden, um eine neue Immuntherapie zu entwickeln, den autoimmunen Diabetes bei der NOD-Maus zu verhindern.