Aus der Klinik für Endokrinologie und Diabetologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

> Funktionsbereich Endokrinologie Leiter: Univ.-Prof. Dr. M. Schott

Endogenes TNF- α und IL-1 β als additive Faktoren bei der Herstellung von IFN-generierten Dendritischen Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

> vorgelegt von Christian Stüßgen

> > 2013

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Schott Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Roland Fenk Meinen Eltern Achim und Karin gewidmet.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Jacobs, B.; Wuttke, M.; Papewalis, C.; Fenk, R.; Stüssgen, C.; Baehring, T. et al. (2008a): Characterization of monocyte-derived IFNalpha-generated dendritic cells. In: *Horm. Metab. Res.* 40 (2), S. 117–121.

Inhaltsverzeichnis

ZusammenfassungIII					
Ab	kürzı	inge	n IV		
1.		Einl	eitung1		
1	.1.	Imm	nunsystem		
1	2.	Den	dritische Zellen 2		
1	.3.	Anti	tumor-Wirkung des Immunsystems4		
1	.4.	Tum	ortherapie mit Dendritischen Zellen5		
1	.5.	Auf	gabenstellung der Arbeit		
2.		Mat	terial und Methoden8		
2	.1.	Mat	erial8		
	2.1.	1.	Verbrauchsmaterialien		
	2.1.2	2.	Verwendete Reagenzien, Chemikalien und Kits 8		
	2.1.3	3.	Zytokine9		
	2.1.4	4.	Antikörper 9		
	2.1.	5.	Puffer und Medien 10		
	2.1.	6.	Geräte		
	2.1.	7.	Verwendete Software 11		
2	.2.	Met	hoden12		
	2.2.	1.	Isolierung mononukleärer Zellen aus humanem Blut12		
	2.2.2	2.	Zellaufbereitung13		
	2.2.3	3.	Zellzahlermittlung 14		
	2.2.4	4.	Isolierung von CD14-positiven Monozyten mittels magnetischer Zellsortierung 14		
	2.2.	5.	Trennung von CD56-positiven und CD56-negativen Zellen mittels magnetischer Zellsortierung		
	2.2.	6.	Zellkultur und Stimulation von Monozyten 17		

	2.2.7	Zellkultur von CD56-positiven und CD56-negativen IFN-DCs	8
	2.2.8	 Die direkte extrazelluläre Zellmarkierung mit Antikörpern zur durchflusszytometrischen Analyse1 	8
	2.2.9	Bestimmung der TNF- α und IL-1 β Konzentration durch ELISAs	1
	2.3.	Statistische Analyse und Datenaufbereitung 2	3
3.		Ergebnisse2	5
	3.1.	Darstellung der mononukleären Zellen (PBMCs) nach Ficoll-Isolierung	5
	3.2.	Darstellung der CD14-positiven Monozyten nach magnetischer Zellsortierung2	7
	3.3.	Ausreifung der IFN-DCs an den Tagen 3 und 5 der Inkubation	9
	3.4.	Expression von CD56 auf IFN-DCs	3
	3.5.	Untersuchung von CD56-positiven und CD56-negativen IFN-DCs	4
	3.6.	TNF- α im Überstand der Zellkultur	5
	3.7.	IL-1β im Überstand der Zellkultur	6
4.		Diskussion3	7
	4.1.	Generierung von IFN-DCs	7
	4.2.	CD56-Expression auf IFN-DCs4	2
,	4.3.	TNF- $lpha$ und IL-1 eta im Überstand der Zellkultur44	4
,	4.4.	Fazit und Ausblick 4	9
5.		Literaturverzeichnis	2
6.		Danksagung	

7. Eidesstattliche Versicherung

Zusammenfassung

Im Rahmen von Tumorerkrankungen werden Immuntherapien erforscht, um neue Therapieoptionen zu entwickeln. Für das metastasierte medulläre Schilddrüsenkarzinom z.B., existiert bisher keine kurative Therapie. In einem neuen Therapieansatz wird versucht Dendritische Zellen (DCs), die eine Schlüsselposition im Rahmen der Immunantwort einnehmen, therapeutisch nutzbar zu machen. Um DCs für Immuntherapien verwenden zu können, müssen diese in ausreichender Zahl vorliegen und gut charakterisiert sein. Hier soll die vorliegende Arbeit einen Beitrag leisten.

Eine Möglichkeit DCs zu generieren, wurde im Jahr 2000 von Santini beschrieben. Hierbei werden aus humanem peripherem Blut Monozyten gewonnen, die mit IFN- α und GM-CSF inkubiert werden. Dabei entstehen sogenannte IFN-DCs. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode angewendet.

Dabei wurden zunächst die IFN-DCs durchflusszytometrisch nach typischen DC-Oberflächenmarkern charakterisiert, um die Entstehung von IFN-DCs zu bestätigen. Desweiteren konnte das für Natürliche Killer-Zellen (NK) und Natürliche Killer-T-Zellen (NKT) bekannte Oberflächenantigen CD56 auf den IFN-DCs durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Interessant für die Entwicklung von Immuntherapien ist CD56, da es auf eine zytolytische Potenz der IFN-DCs hinweist.

Um die Frage zu klären, ob es sich bei den CD56-positiven und CD56-negativen DCs um unterschiedliche DC-Zellpopulationen oder um eine DC-Zellpopulation in unterschiedlicher Differenzierung handelt, wurden die CD56-negativen IFN-DCs nach drei Tagen Kultivierung isoliert und in Nährlösung ohne Zugabe von Stimuli über 36 Stunden weiterinkubiert. Nach 36 Stunden konnte eine deutliche Zunahme an CD56-positiven IFN-DCs nachgewiesen werden. Das weist darauf hin, dass es sich bei den CD56-positiven und CD56-negativen IFN-DCs am ehesten um eine Population in unterschiedlicher Differenzierung handelt.

Bei der weiteren Untersuchung der IFN-DCs konnten im Zellkultur-Überstand die Zytokine TNF- α und IL-1 β nachgewiesen werden. Diese beiden Zytokine können, wie in der Literatur bei der Herstellung von DCs beschrieben, die Reifung von DCs fördern. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen darauf schließen, dass bei der Generierung von IFN-DCs vor allem endogen entstandenes TNF- α als additiver Faktor eine Rolle für die Ausreifung der IFN-DCs spielt. Die nur leicht erhöhten Konzentrationen von endogen entstandenem IL-1 β lassen eine entscheidende Beeinflussung der Ausreifung von IFN-DCs durch IL-1 β unwahrscheinlich erscheinen.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die IFN-DCs noch besser zu charakterisieren und für Therapien nutzbar zu machen.

Abkürzungen

CD	Cluster of Differentiation
	(immunphänotypische Unterscheidungsgruppe)
CTL	Cytotoxic T-Lymphocyte (Zytotoxische T-Zelle)
DC	Dendritic Cell (Dendritische Zelle)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (Durchflusszytometrie)
FSC	Forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
a	Vielfaches der mittleren Erdschwerebeschleunigung
5	
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
	(Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor)
IENI	(Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor)
IFN	(Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) Interferon
IFN IKDC	(Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) Interferon Interferon Producing Killer Dendritic Cell
IFN IKDC	(Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) Interferon Interferon Producing Killer Dendritic Cell (Interferon-produzierende Killer-DC)
IFN IKDC	(Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) Interferon Interferon Producing Killer Dendritic Cell (Interferon-produzierende Killer-DC)
IFN IKDC IL	(Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) Interferon Interferon Producing Killer Dendritic Cell (Interferon-produzierende Killer-DC) Interleukin
IFN IKDC IL LPS	(Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) Interferon Interferon Producing Killer Dendritic Cell (Interferon-produzierende Killer-DC) Interleukin Lipopolysaccharide
IFN IKDC IL LPS	(Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) Interferon Interferon Producing Killer Dendritic Cell (Interferon-produzierende Killer-DC) Interleukin Lipopolysaccharide
IFN IKDC IL LPS MHC	(Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) Interferon Interferon Producing Killer Dendritic Cell (Interferon-produzierende Killer-DC) Interleukin Lipopolysaccharide Major Histocompatibility Complex

MACS	Magnetic Activated Cell Sorting (magnetische Zellsortierung)
MW	Mittelwert
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
NKT-Zelle	Natürliche Killer-T-Zelle
РВМС	Peripheral Blood Mononuclear Cell (mononukleäre Zelle des peripheren Blutes)
upm	Umdrehungen pro Minute
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute-Medium
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler)
SSC	Side scatter (Seitwärtsstreulicht)
STABW	Standardabweichung
TH-Zelle	T Helfer-Zelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAIL	TNF-related Apoptosis Inducing Ligand (TNF-verwandter Apoptose-induzierender Ligand)
U	Unit (atomare Masseneinheit)

1. Einleitung

1.1. Immunsystem

Das Immunsystem besteht aus Komponenten, die gemeinsam auf das Eindringen von körperfremden Stoffen reagieren können und so den Körper vor Schaden bewahren. Es kann in zwei Teile unterteilt werden, die angeborene und die erworbene, auch adaptierte Immunabwehr genannt. Dies bedeutet, dass spezielle Zellen im Körper eingedrungene Pathogene (z.B. Viren oder Bakterien) erkennen und entweder direkt reagieren können (angeborene Immunität) oder hierzu eine Aktivierung und Spezialisierung benötigen (adaptierte Immunität). Die Funktionen des Immunsystems erstrecken sich dabei nicht nur auf Infektionskrankheiten, sondern auch auf onkologische Erkrankungen (Janeway 2009). Im Rahmen von Immuntherapien sollen die Fähigkeiten des Immunsystems zur Therapie von malignen Erkrankungen nutzbar gemacht werden.

Die angeborene Immunabwehr wird zellulär in erster Linie durch Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) und Makrophagen repräsentiert. Bei der adaptierten Immunabwehr spielen B- und T-Zellen eine große Rolle. Auf der Schlüsselposition der adaptierten Immunabwehr befinden sich Dendritische Zellen (DCs). Sie initiieren und koordinieren die Immunantwort und stellen eine entscheidende Verbindungsstelle zwischen der angeborenen und erworbenen Immunabwehr dar. Als Reaktion auf die Erkennung von Fremdantigenen produzieren sie Zytokine und regulieren kostimulatorische Zytokine hoch. Im Folgenden werden T-Zellen aktiviert. Dies macht DCs interessant für die Entwicklung von Immuntherapien.

1.2. Dendritische Zellen

DCs gelten als hochpotente antigenpräsentierende Zellen. Dies bedeutet, dass sie Fremdantigene aufnehmen, prozessieren und präsentieren. Morphologisch haben DCs durch ihre dünnen und langen (> 10 µm) Ausläufer ein sternenförmiges Aussehen, welches mit ihren Funktionen, u.a. der Aufnahme von Antigenen und deren Präsentation, korreliert (Banchereau und Steinman 1998). DCs können in unterschiedlichen Reifestadien vorliegen und unterscheiden sich dabei in ihren funktionellen Fähigkeiten.

Unreife DCs haben die ausgeprägte Fähigkeit der Aufnahme von Antigenen, welche durch Phagozytose, Makropinozytose und Rezeptoren erfolgt (Fernandez et al. 1999; Kadowaki et al. 2001). Die aufgenommenen Antigene werden verarbeitet und die DCs wandern in lymphatische Organe, z.B. Lymphknoten, um dort die Antigene, dann bereits als reife DCs, in Peptidgröße mit den Haupthistokompatibilitätskomplex- (MHC-) Molekülen auf der Zelloberfläche an naive T-Lymphozyten zu präsentieren. Die Wanderung der DCs wird durch verschiedene Stimuli, wie mikrobielle Antigene, inflammatorische Chemokine oder Tumor-Nekrose-Faktor- (TNF-) α und Interleukin- (IL-) 1, ausgelöst (Moser und Murphy 2000). Im Prozess der Reifung verändern sich auch die auf der Oberfläche exprimierten Moleküle. So nimmt die Expression der für die Aktivierung der T-Zellen benötigten kostimulatorischen Moleküle mit der immunphänotypischen Unterscheidungsgruppe (CD) 80 und CD86 (Caux et al. 1994a) und der Reifungsmarker CD83 (Lechmann et al. 2002; Zhou und Tedder 1995; Romani und Schuler) zu, während die Expression von Antigenrezeptoren (z.B. Fc-Rezeptoren und der Lymphozytenrezeptor DEC205) herunterreguliert wird (Banchereau und Steinman 1998; Théry und Amigorena 2001). Zudem werden deutlich mehr MHC-Moleküle auf der Oberfläche präsentiert (Mellman und Steinman 2001).

Zur Präsentation der Fremd-Antigene benötigen antigenpräsentierende Zellen insbesondere diese MHC-Moleküle auf der Oberfläche (Germain 1994). Die MHC-Moleküle werden mit dem Antigen beladen und präsentieren dieses an der Zelloberfläche. Endogen aufgenommene Antigene, wie z.B. Virusantigene, werden über MHC I präsentiert, während exogen aufgenommene Antigene, wie z.B. bakterielle Antigene über MHC II präsentiert werden (Banchereau und Steinman 1998). Die Zellen, denen diese Antigene präsentiert werden, sind neben B-Lymphozyten vor allem via MHC II die CD4-positiven T-Zellen und via MHC I die CD8-positiven T-Zellen (Banchereau und Steinman 1998; Tosi et al. 2004).

Durch Präsentation der Fremdantigene reifen die naiven CD4-positiven T-Zellen zu T Helfer-Zellen (TH-Zellen) heran und übernehmen verschiedene Funktionen im Rahmen der Immunantwort. Für die Aktivierung der T-Zelle sind die, von der DC exprimierten, kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 notwendig (Caux et al. 1994b). Die TH-Zellen schütten Zytokine aus, vor allem Interferon- (IFN-) γ, welches DCs, Makrophagen, NK-Zellen und Natürliche Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) sowie zytotoxische T-Zellen (CTLs) aktiviert (Banchereau und Steinman 1998; Fernandez et al. 1999). Hier findet sich somit eine Verbindung der adaptierten zur angeborenen Immunabwehr.

Die naiven CD8-positiven T-Zellen differenzieren durch die Antigen-Erkennung zu antigenspezifischen CTLs, die direkt über die Ausschüttung von zytotoxischen Stoffen, wie verschiedenen Granzymen und Perforin, Zellen zerstören können (Griffiths 1995; Inaba et al. 1987; Young und Steinman 1990). Die humorale Immunantwort induzieren sie durch die Aktivierung von naiven B-Lymphozyten und auch B-Gedächtnis-Zellen (Banchereau und Steinman 1998; Jego et al. 2003). Taieb et al. sowie Chan et al. berichteten 2006 im Mausmodell von sogenannten *interferon producing killer dendritic cells* (IKDCs) (Taieb et al. 2006; Chan et al. 2006). Diese Zellen vereinen Eigenschaften von DCs und NK-Zellen. Interessant im Rahmen von DC-Immuntherapien ist die beschriebene Eigenschaft der IKDCs, typische NK-Zielzellen über den TNF-verwandten Apoptose-induzierenden Ligand-(TRAIL-) Signalweg direkt zu töten. Papewalis et al. zeigten in diesem Zusammenhang eine ausgeprägte Expression des Oberflächenmarkers CD56 auf der Oberfläche von DCs, die aus Monozyten unter Stimulation mit IFN-α und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) generiert wurden (IFN-DCs). In der Arbeit wird von einer direkten zytolytischen Aktivität der CD56-positiven IFN-DCs gegen Tumorzellen über den TRAIL-Signalweg berichtet (Papewalis et al. 2008b). CD56 wurde bisher als typisch für NK-Zellen (Farag und Caligiuri 2006) und NKT-Zellen (Ou et al. 2002) angesehen. Dies stellt einen interessanten Ansatzpunkt für die Entwicklung von DC-Immuntherapien dar.

1.3. Antitumor-Wirkung des Immunsystems

Angeborene und adaptive Immunabwehr sind an der Antitumor-Wirkung des Immunsystems beteiligt. DCs befinden sich hierbei in der initiierenden und koordinierenden Schlüsselposition, während NK-Zellen (Fernandez et al. 1999), CTLs und NKT-Zellen (Kadowaki et al. 2001) die Wirkung vermitteln (Schott 2006; Steinman 1991; Banchereau et al. 2000).

Hinweise für den Einfluss der zellulären Immunabwehr bei der Bekämpfung von onkologischen Erkrankungen finden sich z.B. in den Arbeiten von Roithmaier und Galon. Hier wurde gezeigt, dass unter Immunsuppression nach Herz- oder Lungentransplantation die Inzidenz für Krebserkrankungen im Vergleich zur Normalpopulation um mehr als das 7-fache anstieg (Roithmaier et al. 2007). Galon et al. beschrieben, dass die An- bzw. Abwesenheit von T-Zellen in resezierten Kolonkarzinomen das klinische *Outcome* beeinflussen und ihre Anwesenheit die Prognose der Patienten deutlich verbesserte (Galon et al. 2006). In anderen Arbeiten konnte ein Einfluss des Immunsystems auch bei weiteren Tumorerkrankungen gezeigt werden (Piersma et al. 2007; Kohrt et al. 2005; Sharma et al. 2007; Dave et al. 2004; Wahlin et al. 2007).

1.4. Tumortherapie mit Dendritischen Zellen

Durch ihre zentralen Funktionen im Rahmen der Immunabwehr und einer geringen Immunogenität von Tumoren, stellen die DC einen interessanten Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Tumortherapien dar (Steinman und Dhodapkar 2001; Banchereau und Steinman 1998; Schuler et al. 2003; Schuler und Steinman 1997).

Für mögliche Therapien von malignen Erkrankungen mit DCs gibt es verschiedene Ansätze. Es ist möglich DCs *in vitro* mit autologem Tumorlysat zu inkubieren und die mit dem Tumorantigen beladenen DCs dem Patienten zu reinjizieren. Neben Tumorlysat wurden *in vitro* generierte DCs auch mit Tumorantigenen aus apoptotischen Zellen (Albert et al. 1998), mit Tumor-RNA (Ashley et al. 1997) oder autologen Tumorzellen (Gong et al. 1997) inkubiert. Nach Aufnahme des Tumorantigens können diese DCs *in vivo* die Antigene T-Zellen präsentieren und so eine tumorspezifische Immunantwort induzieren (Hsu et al. 1996; Fields et al. 1998; Schuler et al. 2003). Albert et al. zeigten, dass Antigene von apoptotischen Zellen, wie z.B. Tumorzellen, über MHC I präsentiert werden und CD8-positive CTLs aktivieren (Albert et al. 1998). Die erste klinische Studie zur Anwendung von mit Tumorantigen gepulsten DCs zeigten 1995 Mukherji et al.. Ein von der Melanomzelle über MHC I präsentiertes Peptid war bekannt, sodass mit diesem Peptid beladene DCs peptidspezifische CTLs aktivieren konnten (Mukherji et al. 1995).

Beispiele erfolgreicher Anwendungen mit Auslösung einer Tumorlysatspezifischen Immunantwort zeigten Schott et al. bei einem Patienten mit Nebenschilddrüsenkarzinom (Schott et al. 1999), einem Patienten mit neuroendokrinen Pankreastumor (Schott et al. 2001a), sowie beim medullären Schilddrüsenkarzinom (Schott et al. 2001b).

Weitere Tumorerkrankungen, bei denen mit spezifischem Antigen beladene DCs eine Immunantwort auslösten, sind z.B. das Mammakarzinom,

5

B-Zelllymphom, Lungenkarzinom, Melanom und Pankreaskarzinom, sowie das Prostatakarzinom (Finn 2008).

Die Ergebnisse von klinischen Studien bezüglich der Wirksamkeit von DC-Immuntherapien sind uneinheitlich, aber durch viele positive Berichte vielversprechend (Schott 2006). Problematisch gestaltet sich die Bewertung durch fehlende Langzeitstudien und fehlende Studien mit größeren Patientengruppen. Erschwerend kommt hinzu, dass es keine anerkannten standardisierten Protokolle für die Generierung der DCs gibt (Schott 2006; Nestle et al. 2005). Dennoch lassen erfolgreiche Studien immer wieder das Potential einer DC-Immuntherapie erkennen. Für das metastasierte medulläre Schilddrüsenkarzinom z.B., gibt es bisher keine kurative Therapie. Zwei kleinere Studien zeigten, dass eine Immuntherapie mit antigenspezifischen DCs das konventionelle Setting entscheidend ergänzen kann (Schott und Seissler; Schott und Scherbaum 2004; Papewalis et al. 2008a). Generierte autologe DCs von Patienten mit medullärem Schilddrüsenkarzinom wurden mit tumorspezifischem Calcitonin beladen. Nach der Immuntherapie zeigte sich, dass ein Teil der Patienten einen deutlichen Anstieg von tumorspezifischen IFN-y sezernierenden CD4-positiven T-Zellen und Granzym B-positiven CD8-positiven T-Zellen aufwiesen (Schott et al. 2002; Papewalis et al. 2008a).

1.5. Aufgabenstellung der Arbeit

Die Arbeit steht im Kontext der Erforschung neuer Therapieoptionen bei Patienten mit metastasiertem medullärem Schilddrüsenkarzinom. Hierbei sind die DCs in den Fokus gerückt, mit deren Hilfe das Immunsystem gegen Tumorzellen gerichtet werden soll. Für die weitere Erforschung von DC-Immuntherapien muss eine ausreichende Menge von gut charakterisierten DCs zur Verfügung stehen. Ein Protokoll, gestützt auf eine Arbeit von Santini (Santini et al. 2000), verwendete aus humanem peripherem Blut isolierte Monozyten, die in der Zellkultur mit Hilfe von IFN-α und GM-CSF zu sogenannten IFN-DCs stimuliert wurden. Die vorliegende Arbeit soll das Wissen über *in vitro* generierte IFN-DCs erweitern, um die Generierung der IFN-DCs zu verbessern und um zuverlässig optimale Zellen für DC-Immuntherapien herstellen zu können. In der Arbeitsgruppe von Prof. Schott wurden im Rahmen der Erforschung von DCs und DC-Immuntherapien mehrfach DCs für verschiedene Untersuchungen nach unterschiedlichen Protokollen generiert (Schott et al. 2000; Schott et al. 1999; Schott et al. 2001b; Schott et al. 2001a; Papewalis et al. 2008a; Papewalis et al. 2008b; Papewalis et al. 2006; Jacobs et al. 2008a).

Die Hypothese dieser Arbeit ist, dass neben den zugegebenen Zytokinen noch weitere Faktoren existieren, die die Ausreifung der Monozyten zu IFN-DCs fördern. Zwei Zytokine, die für die Förderung der Reifung von DCs bekannt sind, sind TNF- α und IL-1 β (Sallusto et al. 1995; Jonuleit et al. 1996; Girolomoni und Ricciardi-Castagnoli 1997). In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob diese Zytokine eine Rolle bei der Ausreifung der IFN-DCs spielen, ohne dass sie der Zellkultur zugegeben wurden.

Neben den typischen DC-Ausreifungsmarkern sollte eine mögliche Expression von CD56 auf IFN-DCs zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation untersucht werden. Dieser Marker deutet auf eine zytolytische Potenz der IFN-DCs hin, welche für die Entwicklung von Immuntherapien interessant ist (Papewalis et al. 2008b). In diesem Zusammenhang sollte im Falle des Nachweises von CD56 mit einer Nachinkubation untersucht werden, ob sich bei es den CD56-positiven IFN-DCs und den CD56-negativen IFN-DCs um eine Zellpopulation in unterschiedlicher Differenzierung oder um zwei verschiedene Zellpopulationen handelt.

Diese Arbeit leistet einen Beitrag zur Erforschung von DC-Immuntherapien.

7

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Verbrauchsmaterialien

- Ficoll-Röhrchen, BD Vacutainer
 ® CPT™, Ficoll 2,0 ml, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Pipetten-Spitzen, TipOne, Starlab, Ahrensburg, Deutschland
- Stripetten, Costar Stripette, Corning, New York, USA
- Falcons (15 und 50 ml), Cellstar® tubes, greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
- MACS Pre-Separation Filter (30 µm), Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland
- Zell-Isolations-Säulen, MACS Separation Columns, Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland
- Mini MACS / Midi MACS Separator, Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland
- Eppendorf Röhrchen (1,5 ml), Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Zellzählkammer, Neubauer Improved Bright-Line, Tiefe 0,1 mm, Brand,
 Wertheim, Deutschland
- Deckgläschen, Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
- 6-Well-Platten, Nunclon[™] Surface, Nunc, Roskilde, Dänemark
- FACS-Röhrchen, FACS tubes, Sarstedt Nümbrecht, Deutschland
- Kryoröhrchen, Nalgene Cryoware™, Nunc International, Rochester, NY, USA

2.1.2. Verwendete Reagenzien, Chemikalien und Kits

- Monocyte Isolation Kit II human, Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland
- CD56 MicroBeads, Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland
- CD3 MicroBeads, Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland
- FcR Blocking Reagent, Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland

- Trypanblau, Trypan blue solution 0,4%, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim,
 Deutschland
- ELISA Kit Quantikine® Human TNF-α, R&D Systems, Minneapolis, USA
- ELISA Kit Quantikine® Human IL-1β, R&D Systems, Minneapolis, USA
- FACSFlow, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- FACSRinse, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- FACSClean, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

2.1.3. Zytokine

- rekombinantes humanes GM-CSF, Leukine

 ß, Berlex Laboratories, Richmond, CA, USA
- IFN- α , Roferon® A, Roche, Mannheim, Deutschland

2.1.4. Antikörper

Die hier aufgeführten Antikörper wurden alle von BD Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland bezogen.

 – λ488 (FITC): 	CD19 (Klon: 4G7, Isotyp IgG1)
	CD45 (Klon: 2D1, Isotyp IgG1)
	CD80 (Klon: L307.4, Isotyp IgG1)
	IgG1 (Klon: MOPC-21, Isotyp IgG1)

- λ512 (PE)
 CD14 (Klon: MfP9, Isotyp IgG2b)
 CD45 (Klon: HI30, Isotyp IgG1)
 CD83 (Klon: HB15e, Isotyp IgG1)
 CD86 (Klon: IT2.2, Isotyp IgG2b)
 IgG1 (Klon: MOPC-21, Isotyp IgG1)
 IgG2b (Klon: MPC-11, Isotyp IgG2b)

- λ586 (PerCP)
 CD3 (Klon: SK7, Isotyp IgG1)
 CD45 (Klon: 2D1, Isotyp IgG1)
 IgG1 (Klon: MOPC-21, Isotyp IgG1)
- λ648 (APC)
 CD45 (Klon: 2D1, Isotyp IgG1)
 CD56 (Klon: NCAM 16.2, Isotyp IgG2b)
 IgG1 (Klon: MOPC-21, Isotyp IgG1)
 IgG2b (Klon: 27-35, Isotyp IgG2b)

2.1.5. Puffer und Medien

- Auto MACS running buffer, Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland
- Erythrocyte lysis buffer, Qiagen, Hilden, Deutschland
- RPMI 1640, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.6. Geräte

- Mikrobiologische Sicherheitswerkbank, Herasafe, Heraeus, Hanau, Deutschland
- Pipetten Eppendorf Reference, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Pipette Pipetus®, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
- Vortex REAX 2000, Heidolph, Kehlheim, Deutschland
- Handstückzähler, IVO, Villingen-Schwenningen, Deutschland
- Flockeneisbereiter, NordCap SPR 80, Stettner Kühlanlagen, Mainz, Deutschland
- Mikroskop Wilovert®, Hund GmbH, Wetzlar Deutschland
- Brutschrank Heracell (37,0° C, 5% CO2), Heraeus, Hanau, Deutschland
- Kühlschrank, Liebherr Premium (3°C, 30% Luftfeuchtigkeit), Liebherr,
 Ochsenhausen, Deutschland
- Gefrierschrank, Liebherr Premium (-20° C), Liebherr, Ochsenhausen,
 Deutschland

- FACS Gerät, FACSCalibur, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Zentrifuge, Rotixa/RP, Hettich, Tuttlingen, Deutschland
- Tischkühlzentrifuge, Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Biofuge Pico, Heraeus, Hanau, Deutschland
- Mikrotiterplatten Schüttler, AM 169, Dynex Technologies, Denkendorf, Deutschland
- Mikroplatten-Reader Sunrise, Tecan, Crailsheim, Deutschland

2.1.7. Verwendete Software

- FACSCalibur, CellQuestPro, BD, San Jose, USA
- Statistische Auswertung, Excel 2007, Microsoft Corporation, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Isolierung mononukleärer Zellen aus humanem Blut

Aus peripherem Blut gesunder Spender wurden mononukleäre Zellen (*peripheral blood mononuclear cells* = PBMCs) gewonnen (Ethikvotum Nr. 2608). Aus diesen PBMCs wurden wiederum die verwendeten Monozyten isoliert.

Durch Venenpunktion an der oberen Extremität wurden je zwischen 48 und 240 ml Blut in Ficoll-Röhrchen (8 ml pro Ficoll-Röhrchen) entnommen und 20 Minuten bei 1750-facher Beschleunigung der mittleren Erdschwerebeschleunigung (g) zentrifugiert. Mit Hilfe der Dichtegradienten-Zentrifugation wurden die zellulären Blutbestandteile dabei, entsprechend ihrer spezifischen Dichte, voneinander getrennt. Für diese Arbeit wurden fertige CPT Vacutainer® der Firma BD Biosciences benutzt, da sie mit dem in der Klinik zur Blutentnahme verwendeten BD Vacutainer® System kompatibel sind. Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen befanden sich nach der Zentrifugation aufgrund ihrer im Vergleich zum Ficoll höheren Dichte unterhalb der Ficollschicht. Die PBMCs (wie B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, T-Zellen u.a.) weisen eine niedrigere Dichte als die Ficollschicht auf und sammelten sich somit bei Zentrifugation oberhalb der Ficollschicht, in der sogenannten Interphase zwischen Plasma und Ficoll (Abb. 2.1).



Abb. 2.1: Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation (in Anlehnung an Roitt, Brosthoff, Male (1995): Kurzes Lehrbuch der Immunologie, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York) Die zellulären Blutbestandteile im Ficoll-Röhrchen werden durch Zentrifugation entsprechend ihrer spezifischen Dichte voneinander getrennt. So können die mononukleären Zellen (PBMCs), die sich nach Zentrifugation über der Ficollschicht anordnen, nach Entfernen des Plasmas gewonnen werden.

2.2.2. Zellaufbereitung

Nachdem das Plasma vorsichtig abpipettiert wurde, wurde die PBMC-Phase entnommen und in separaten Falcon-Röhrchen (15 ml) zusammengeführt. Die Zellen wurden in *Roswell Park Memorial Institute-* (RPMI-) Medium aufgenommen und gewaschen, d.h., wenn nicht anders angegeben, 5 Minuten bei 10° C mit 1400 Umdrehungen pro Minute (upm) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit RPMI-Medium resuspendiert. Um unspezifische Aggregationen zu entfernen, wurde die Suspension im nächsten Schritt über einen Filter (30 µm) gegeben. Hieran wurde ein weiterer Waschschritt angeschlossen. Unerwünschte Erythrozyten wurden im nächsten Schritt mit Hilfe eines hypertonischen Puffers (*Erythrocyte lysis buffer*) durch 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur lysiert. Durch Zugabe des verwendeten Nährmediums (RPMI) wurde die Lyse gestoppt und wiederum ein Waschschritt angeschlossen.

2.2.3. Zellzahlermittlung

Die Zellen wurden in 1 ml RPMI resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden 10 μ l entnommen und mit 100 μ l Trypanblau in einem Eppendorfhütchen gemischt (1:11). Von der Zellsuspension wurden 10 μ l in eine Neubauer Zählkammer gegeben. Da Trypanblau tote Zellen aufgrund ihrer defekten Zellmembran anfärbt, wurden blau gefärbte Zellen bei der Zählung ausgeschlossen. Gezählt wurden die Zellen in 4 Großquadraten unter dem Lichtmikroskop. Die Kammer hat eine Tiefe von 0,1 mm, weswegen die gezählte Zellzahl mit 10⁴ multipliziert wurde. Die Zellzahl pro ml Zellsuspension wurde nach folgender Formel bestimmt:

durchschnittliche Zellen/Quadrat x Verdünnungsfaktor x 10⁴.

2.2.4. Isolierung von CD14-positiven Monozyten mittels magnetischer Zellsortierung

Um eine möglichst reine Population an Monozyten aus der Zellsuspension zu gewinnen, wurde zur Zellsortierung das magnetische Zelltrennungssystem *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS) der Firma Miltenyi Biotec GmbH verwendet (Miltenyi et al. 1990).

Hierbei wurde die charakteristische Expression von Oberflächenmolekülen auf Nicht-Monozyten dazu genutzt, Biotin-gekoppelte Antikörper an diese zu binden (Abb. 2.2 A). Der verwendete Antikörper-Cocktail des *Monocyte Isolation Kit* 2 der Firma Miltenyi Biotec GmbH enthielt biotinylierte anti-CD3, anti-CD7, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD56, anti-CD123 und anti-Glycophorin A Antikörper. Das Biotin war im nachfolgenden Schritt die Bindungsstelle für magnetische Partikel, sogenannte *Beads* (Abb. 2.2 B). Die Zellen wurden hierfür zunächst gezählt und ein Waschschritt angeschlossen. Dann wurden die PBMCs mit 30 µl gekühltem MACS-Puffer, 10 µl *FcR-Blocking Reagent* (zur Blockierung unspezifischer FcR-Bindungsstellen) und 10 µl Antikörper-Cocktail (Abb. 2.2 A) (jeweils pro 1 X 10^7 Zellen) gemischt und für 10 Minuten im Kühlschrank bei 4-8°C

inkubiert. Im folgenden Schritt wurden die Zellen erneut mit 30 µl gekühltem MACS-Puffer resuspendiert und zur magnetischen Markierung (Abb. 2.2 B) der beladenen Zellen 20 µl der Anti-Biotin *MicroBeads* (jeweils pro 1 X 10⁷ Zellen) zugegeben. Nach Durchmischung schloss sich eine Inkubation bei 4-8°C von 20 Minuten an. Die Zellen, die die passenden Oberflächenantigene zu den Antikörpern im Antikörper-Cocktail trugen, waren nun magnetisch markiert.

Die Zellsuspension wurde auf eine mit magnetischen Fasern ausgekleidete Säule gegeben, die in einem starken Magnetfeld platziert war und floss hindurch. Für diesen Vorgang wurden die Zellen in MACS-Puffer aufgenommen. Ein Volumen von 500 µl MACS-Puffer für 1 X 10⁸ Zellen durfte dabei nicht unterschritten werden, da sonst die Säule verstopfen konnte. Die mit magnetischen Partikeln beladenen Zellen wurden in der Säule gebunden, während die unmarkierten Zellen, hier die Monozyten, durch die Säule liefen und aufgefangen werden konnten (Abb. 2.3 A). Nach der Isolation mit Hilfe des *Monocyte Isolation Kit 2*, schloss sich ein zweiter Isolationsschritt mit anti-CD3- und anti-CD56-Antikörpern, entsprechend der Beschreibung des Herstellers an, um die Reinheit der Monozyten weiter zu erhöhen. Entsprechend der Zellzahl wurde aus Kapazitätsgründen der MACS-Säule jeweils eine MS- oder LS- Säule verwendet.



Abb. 2.2: Prinzip der Markierung einer Zelle mit magnetischem Partikel (mit freundlicher Genehmigung der Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, modifiziert)

Im ersten Schritt (A) bindet der mit Biotin beladene und für die gewünschte Oberflächenstruktur spezifische Antikörper an die Zelle. Im nachfolgenden Schritt (B) bindet der mit magnetischem Partikel beladene Antikörper an das Biotin, wodurch die Zelle bei der magnetischen Zellsortierung in der Säule zurückgehalten wird.



Abb. 2.3: Prinzip der magnetischen Zellsortierung (in Anlehnung an Thiel et al. 1998)

Die Zellsuspension mit magnetisch markierten und unmarkierten Zellen wird auf die von einem Magneten umgebene Trennsäule gegeben (A). Nur unmarkierte Zellen können den Magneten passieren und werden aufgefangen. Werden die aufgefangenen Zellen verwendet, spricht man von einer Negativselektion. Im nächsten Schritt kann die Säule vom Magneten getrennt und die magnetisch markierten Zellen aus der Säule gespült werden (B). Verwendet man nun diese Zellen, spricht man von einer Positivselektion. Die für diese Arbeit isolierten Monozyten wurden negativ selektioniert. In weiteren Versuchen wurden CD56-positive Zellen von CD56-negativen Zellen getrennt. Die CD56-positiven Zellen wurden durch direkte Markierung von CD56 positiv selektioniert.

2.2.5. Trennung von CD56-positiven und CD56-negativen Zellen mittels magnetischer Zellsortierung

In weiteren Versuchen sollten CD56-positive DCs von CD56-negativen DCs getrennt werden. Hierzu wurden CD56 *MicroBeads* verwendet. Die CD56 *MicroBeads* bestehen aus monoklonalen Antikörpern gegen humanes CD56 und

tragen zudem magnetische Moleküle. Abweichend zu der in Kapitel 2.2.4 beschriebenen indirekten magnetischen Markierung mit Hilfe von Biotin (Vergl. auch Abb. 2.3), binden hier die Antikörper mit den magnetischen Molekülen direkt an die Zielstrukturen. Die geernteten Zellen wurden dazu zunächst, nach einem Waschschritt, gezählt und dann erneut gewaschen. Hiernach wurden die Zellen in 80 µl MACS-Puffer resuspendiert und 20 µl CD56 *MicroBeads* dazu gegeben (jeweils pro 1 X 10⁷ Zellen). Nach Mischung wurde die Suspension für 15 Minuten bei 4-8°C inkubiert. Nach 15 Minuten wurden die Zellen gewaschen (durch Zugabe von 2 ml MACS-Puffer pro 1 X 10⁷ Zellen). Die CD56-positiven Zellen waren nun magnetisch markiert und wurden nachfolgend, wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, durch die magnetische Säule gegeben. Für diesen Vorgang wurden die Zellen in MACS-Puffer aufgenommen. Ein Volumen von 500 µl MACS-Puffer für 1 X 10⁸ Zellen durfte dabei nicht unterschritten werden, da sonst die Säule verstopfen konnte. Die CD56-positiven und magnetisch markierten Zellen wurden in der magnetischen Säule gebunden, während die CD56-negativen Zellen unter der Säule aufgefangen wurden (Abb. 2.3). Die CD56-positiven, als auch die CD56-negativen Zellen wurden weiter inkubiert.

2.2.6. Zellkultur und Stimulation von Monozyten

Für die Zellkultur wurden 1 X 10⁷ Zellen in 4 ml Kulturmedium gegeben. Als Kulturmedium wurde das industriell angebotene Nährmedium RPMI 1640 verwendet. Die Arbeitsschritte erfolgten jederzeit unter sterilen Bedingungen.

Zur Stimulation der Monozyten wurden dem Kulturmedium pro ml je 1000 *Units* (U) IFN- α und 1000 U GM-CSF zugegeben. Die Zellen wurden bei 37°C über 5 Tage in einer 6-Well-Platte im Brutschrank inkubiert.

Zu den verschiedenen Zeitpunkten der Messungen wurden Zellen geerntet. Dazu wurde die Suspension in einzelnen Wells abpipettiert und in 15 ml Falcon-Röhrchen aufgenommen. Die Wells wurden jeweils mit 2 ml frischem Nährmedium nachgespült. Hieran wurde ein Waschschritt angeschlossen (s.o.). Die Zellen wurden anschließend gezählt (2.2.3) und weiter untersucht.

2.2.7. Zellkultur von CD56-positiven und CD56-negativen IFN-DCs

Für die Zellkultur wurden 1 X 10^7 Zellen in 4 ml Kulturmedium gegeben (2,5 X 10^6 Zellen/ml). Als Kulturmedium wurde das industriell angebotene Nährmedium RPMI 1640 verwendet. Die Arbeitsschritte erfolgten jederzeit unter sterilen Bedingungen.

Dem Kulturmedium wurden keine zusätzlichen Substanzen zugegeben. Die Zellen wurden bei 37°C über weitere 36 Stunden in einer 6-Well-Platte im Brutschrank kultiviert und nach diesen 36 Stunden geerntet. Dies erfolgte wie in Abschnitt 2.2.6 beschrieben. Hieran wurde ein Waschschritt angeschlossen. Die Zellen wurden nun gezählt und nach extrazellulärer Zellmarkierung durchflusszytometrisch untersucht.

2.2.8. Die direkte extrazelluläre Zellmarkierung mit Antikörpern zur durchflusszytometrischen Analyse

Die extrazelluläre Zellmarkierung wurde in dieser Arbeit verwendet, um Zellen in Abhängigkeit ihrer Oberflächenmarker durchflusszytometrisch zu charakterisieren. Interessiert haben vor allem Marker, die Aussagen über den Typ der Zelle erlauben (z.B. CD3 für T-Zellen, CD19 für B-Zellen, CD14 für Monozyten), Aussagen über die Ausreifung von IFN-DCs zulassen (CD83, CD80, CD86, CD14) sowie der NK-Zell- und NKT-Zell-Marker CD56.

Das Prinzip der Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting* = FACS) besteht darin, dass in Lösung gebrachte Zellen einzeln durch ein von einem Laser ausgesandtes Licht geführt werden. Hierbei entsteht Streulicht, welches von

Detektoren registriert und auf einen Computer übertragen wird. Durch detektiertes Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) lässt sich die Größe der Zellen bestimmen, während das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) Aussagen über die Granulierung im Zellinnern zulässt. Die erzeugten Daten werden über einen Computer graphisch in einem *Dot-Plot* dargestellt, wodurch die verschiedenen Zellpopulationen differenziert werden können (Abb. 3.1). Durch sogenanntes *gaten* können gezielt die Informationen einzelner Zellpopulationen betrachtet werden, z.B. nur die Monozytenpopulation (Abb. 2.4).



Abb. 2.4: Auswahl einer Zellpopulation durch ein Gate

Um nur die interessierenden Zellen weiter zu untersuchen, können diese in der Darstellung als *Dot-Plot* von einem *Gate* umgeben und damit ausgewählt werden. Alle anderen im *Dot-Plot* dargestellten Zellen werden nicht weiter berücksichtigt.

Zusätzlich können im Durchflusszytometer durch farblich markierte Antikörper oberflächlich liegende Moleküle gezielt markiert werden. Die gekoppelten Farbstoffe werden durch das von Lasern ausgesandte Licht angeregt und strahlen, je nach Fluorochrom, Licht unterschiedlicher Wellenlängen aus. Durch die gemessene Fluoreszenzintensität kann die relative Menge der nachgewiesenen Oberflächenstrukturen ermittelt und über einen Computer graphisch in einem *Dot-Plot* dargestellt werden. Es stehen verschiedene Fluorochrome zur Verfügung. Mit dem verwendeten Durchflusszytometer (BD FACSCalibur) können bis zu vier Farben gleichzeitig gemessen werden. In dieser Arbeit wurden die Fluorochrome FITC, PE, PerCP und APC verwendet. Um eine exakte Darstellung der einzelnen Fluoreszenzen zu erreichen, wurden diese mit Hilfe einer Kompensation voneinander getrennt (elektronisch-rechnerische Korrektur im sich überlappenden Wellenlängenbereich verschiedener Fluorochrome), um damit falsch positive Signale zu verhindern.

Bei der Markierung von Oberflächeneigenschaften der interessierenden Zellen unterscheidet man die direkte und indirekte Markierung. Für diese Arbeit wurden die Zellen ausschließlich direkt mit industriell gefertigten, an Fluorochrom gekoppelten Antikörpern markiert.

Markiert wurden die Oberflächenantigene von PBMCs, Monozyten und IFN-DCs an verschiedenen Tagen ihrer Inkubation.

Für die beschriebene direkte extrazytoplasmatische Zellmarkierung wurden die gewaschenen Zellen zu gleichen Teilen in einem Volumen von 100 µl in MACS-Puffer resuspendiert und auf die FACS-Röhrchen verteilt. Im nächsten Schritt wurden jeweils 10 µl des *FcR Blocking reagents* zugegeben und nach Durchmischung mit Hilfe eines Vortexers für 10 Minuten bei 4-8°C inkubiert. Dieses Reagenz sollte, wie vor der Markierung der Zellen bei der magnetischen Zellsortierung, unspezifische Bindungsstellen besetzen.

Dann wurden jeweils 5 µl der markierenden Antikörper zu den Zellen gegeben und für weitere 15 Minuten bei Dunkelheit und 4-8°C inkubiert. Im Anschluss folgte ein Waschschritt, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen und so störende Hintergrundemissionen bei der Messung minimal zu halten. Die Proben wurden mit je 2 ml MACS-Puffer aufgefüllt und 10 Minuten bei 10°C und 1200 upm zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in eine Trägerflüssigkeit (FACS Flow) aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert. Die Arbeitsschritte erfolgten möglichst jederzeit auf Eis, um ungewollte,

das Ergebnis beeinflussende Reaktionen wie z.B. Proteolyse oder Internalisierung von mit Antikörpern markierten Antigenen, gering zu halten.

2.2.9. Bestimmung der TNF- α und IL-1 β Konzentration durch ELISAs

Der Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) quantifiziert die Zytokinmenge im Mikro- bis Picogramm-Bereich und wurde im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt, um die Konzentration von TNF- α und IL-1 β im Überstand der Zellansätze an verschiedenen Tagen zu bestimmen. Das Prinzip des ELISAs (Avrameas und Guilbert 1971; Engvall und Perlmann 1971) beruht auf der Kopplung eines Antikörpers an das zu messende Antigen, an welchen im nächsten Schritt ein Enzym-tragender Sekundärantikörper (sog. Detektionsantikörper) bindet. Durch die Proportionalität von Antigen zu Primärantikörper und wiederum zu enzymtragendem Antikörper, kann durch die photometrische Bestimmung des durch das Enzym umgesetzten Substrates, welches zu einem Farbumschlag führt, die Antigenkonzentration bestimmt werden.

Alle Zytokinbestimmungen erfolgten mit den kommerziell erhältlichen ELISA-Kits Quantikine® der Firma R&D Systems (Human TNF- α und Human IL-1 β) entsprechend den Angaben des Herstellers.

Zur Gewinnung der Proben wurden von den zu messenden Überständen beim Ernten der Zellen zur durchflusszytometrischen Untersuchung 500 µl in ein Kryo-Röhrchen gegeben und bei -20°C eingefroren.

Zur Durchführung der ELISA-Messungen wurden die Proben auf Eis aufgetaut und zentrifugiert (1300 g, 10 Min., Raumtemperatur), um möglicherweise noch in Suspension befindliche Zellen zu entfernen.

Für jede Messung wurde durch eine Verdünnungsreihe mit bekannten Antigenkonzentrationen eine Standardkurve ermittelt, um durch Vergleich der Farbintensitäten der Proben mit der Standardkurve die Konzentration des entsprechenden Zytokins im Überstand bestimmen zu können. Die minimale messbare Konzentration für TNF- α lag laut Hersteller im Mittel bei 1,6 pg/ml und für IL-1 β bei 0,057 pg/ml.

Für die Quantifizierung von TNF- α wurden 50 µl der im Kit enthaltenen Verdünnungslösung "RD1F" in die einzelnen Wells der mit TNF-α-Antikörpern beschichteten 96-Well-Platte gegeben, um unspezifischen Bindungen von Proteinen vorzubeugen. Es wurden anschließend 200 µl des Standards oder der zu messenden Proben jeweils in ein Well gegeben und diese für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Probe vier Mal mit je 400 µl Waschpuffer (entsprechend den Herstellerangaben zubereitet) gewaschen, um alle nicht gebundenen Bestandteile zu entfernen. Nach dem letzten Waschschritt wurde die Platte umgekehrt auf saugfähige saubere Papiertücher gelegt, um überschüssige Pufferlösung möglichst vollständig zu entfernen. Im nächsten Schritt wurden pro Well 200 µl der Konjugatantikörper-haltigen Lösung zugegeben, woran sich eine Inkubationszeit von einer Stunde anschloss. Hierauf folgte erneut der zuvor beschriebene Waschschritt. Dann wurden 200 µl der im Kit enthaltenen Substratlösung pro Well zugegeben. Die nachfolgende Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur und Dunkelheit. Nach 20 Minuten wurde in jedes Well 20 µl der Stopplösung pipettiert, um die Substratumsetzung zu beenden. Die Messung der Extinktion erfolgte nun bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Korrekturmessung bei einer Wellenlänge von 540 nm. Die TNF Konzentrationen in den Proben wurden mit Hilfe der Extinktion der Standards errechnet.

Für die Quantifizierung von IL-1 β wurden 100 µl der im Kit enthaltenen Verdünnungslösung "RD1-82" in die einzelnen Wells der mit IL-1 β -Antikörpern beschichteten 96-Well-Platte gegeben, um unspezifischen Bindungen von Proteinen vorzubeugen. Es wurden anschließend 150 µl des Standard oder der zu messenden Proben in je ein Well gegeben und diese für drei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert, sodass das zu bestimmende IL-1 β von den am Boden befindlichen Antikörpern gebunden werden konnte. Anschließend wurde die Probe sechs Mal mit je 400 µl Waschpuffer (entsprechend den Herstellerangaben zubereitet) gewaschen, um alle nicht gebundenen Bestandteile zu entfernen. Nach dem letzten Schritt wurde die Platte umgekehrt auf saugfähige saubere Papiertücher gelegt, um überschüssige Pufferlösung möglichst vollständig zu entfernen. Im nächsten Schritt wurden pro Well 200 µl der Konjugatantikörper-haltigen Lösung zugegeben, woran sich eine Inkubationszeit von zwei Stunden auf dem Schüttler anschloss. Hierauf folgte erneut der zuvor beschriebene Waschschritt. Dann wurden 50 µl der im Kit enthaltenen Substratlösung pro Well zugegeben.

Die nachfolgende Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Es wurden anschließend 50 μ l der im Kit enthaltenen Amplifikationslösung zugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler wurde in jedes Well 50 μ l der Stopplösung pipettiert und damit die Reaktion beendet. Die Messung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Korrekturmessung bei einer Wellenlänge von 650 nm. Die IL-1 β Konzentrationen in den Proben wurden mit Hilfe der Extinktion der Standards errechnet.

2.3. Statistische Analyse und Datenaufbereitung

Die statistische Auswertung und Erstellung von Diagrammen erfolgte mit dem Programm Excel 2007[®] der Firma Microsoft. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung oder, aus Gründen der Übersichtlichkeit der graphischen Darstellung, mit Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben.

Mit Hilfe des Computerprogramms *CellQuestPro* wurde die statistische Auswertung der gemessenen Daten der Durchflusszytometrie vorgenommen. Die Verteilung von Oberflächenantigenen auf untersuchten Zellen wurde mit Hilfe von *Dot-Plot*-Diagrammen veranschaulicht. Die *Dot-Plots* wurden aus dem Programm *CellQuestPro* exportiert.

23

Mit Hilfe des unverbundenen T-Tests wurde die Ausprägung der Ausreifung von CD56 auf IFN-DCs und die Konzentration der Zytokine im Überstand auf Signifikanz untersucht. Als signifikant unterschiedlich galt ein Wert von p < 0,05 (*).

3. Ergebnisse

Falls nicht anders angegeben, werden die Daten der Messungen als Mittelwerte ± Standardabweichung (MW ± STABW) angegeben.

3.1. Darstellung der mononukleären Zellen (PBMCs) nach Ficoll-Isolierung

Humane PBMCs wurden, wie in den Kapiteln 2.2.1 und 2.2.2 beschrieben, aus dem peripheren Blut von Probanden gewonnen und von unerwünschtem Material (z.B. verbliebenen Erythrozyten) befreit.

In der Durchflusszytometrie erfolgte über die Charakterisierung der Granularität und Zellgröße die Differenzierung verschiedener Zellpopulationen, sodass die Lymphozyten- und Monozytenpopulation sichtbar als *Dot-Plot* dargestellt werden konnten (Abb. 3.1).



Abb. 3.1: Darstellung der Lymphozyten- und Monozytenpopulation nach Granularität und Zellgröße

PBMCs wurden, neben der Färbung verschiedener Zell-Marker mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern, im Durchflusszytometer nach Granularität und Größe charakterisiert. Im *Gate* R2 ist die Monozytenpopulation und im *Gate* R3 die Lymphozytenpopulation dargestellt. Die Population der Monozyten wurde im Weiteren untersucht.

Nach Markierung der interessierenden Oberflächenantigene mit verschiedenen fluoreszierenden Antikörpern (2.2.5)wurde der Anteil der diese Oberflächenantigene tragenden Zellen im Durchflusszytometer ermittelt. Gemessen wurden der Anteil an positiven Zellen für den Monozyten-Marker CD14, den T-Lymphozyten-Marker CD3, sowie den B-Lymphozyten-Marker CD19, um die normale Verteilung der Zellen der PBMCs nachzuweisen. Im normalen Vollblut stellen T-Zellen (CD3) den größten Anteil dar, der Anteil an B-Zellen (CD19) und NK-Zellen beläuft sich auf 5-20%. Monozyten haben im Normalfall einen Anteil von 5-15%.

In den, aus peripherem Blut gewonnenen, PBMCs belief sich der Anteil von CD14-positiven Zellen auf 9,29% (\pm 9,37%), von CD3-positiven Zellen (CD3 = T-Lymphozyten-Marker) auf 69,27% (\pm 7,32%) und von CD19-positiven Zellen (CD19 = B-Lymphozyten-Marker) auf 10,82% (\pm 3,01%) (Abb.3.2, n=5).





Mit Hilfe der Dichtegradienten-Zentrifugation wurden die mononukleären Zellen (PBMCs) aus menschlichem Vollblut isoliert. Nach anschließender Reinigung von unerwünschtem Material, wie z.B. Erythrozyten, und einer Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmte Oberflächenmarker der PBMCs untersucht. Hier sind die gemessenen Anteile der Oberflächenmarker an den gewonnenen PBMCs gezeigt (CD3 = T-Zell-Marker, CD19 = B-Zell-Marker, CD14 = Monozyten-Marker); n=5.

3.2. Darstellung der CD14-positiven Monozyten nach magnetischer Zellsortierung

Im nächsten Schritt sollten CD14-positive Monozyten mit möglichst großer Reinheit aus den PBMCs gewonnen werden. Nach magnetischer Zellsortierung (2.2.4) der gewonnenen Zellen wurden die CD14 Oberflächenantigene mit Antikörpern markiert. Im Durchflusszytometer wurde die Reinheit der CD14-positiven Monozyten bestimmt. Diese belief sich im Mittel auf 98,15% (\pm 1,58%) für CD14 (Abb.3.3 und 3.4, n=6).



Abb. 3.3: Reinheit der CD14-positiven Monozyten

Die in Abb. 3.2 beschriebenen PBMCs wurden mit Hilfe der magnetischen Zellsortierung aufgereinigt. Die Reinheit der verwendeten CD14-positiven Monozyten wurde durch Messung des Oberflächenmarkers CD14 im Durchflusszytometer untersucht. Bei den Präparationen wurden Reinheiten von 96,21 – 100% erreicht; n=6.

Zur Charakterisierung der Zellen im Durchflusszytometer wurden die Zellen vor und nach magnetischer Zellsortierung in Abhängigkeit der Granularität und Größe differenziert. Die interessierende Zellpopulation (Abb. 3.4 B) wurde ausgewählt, sodass z.B. tote Zellen das Ergebnis nicht beeinflussten. Um die mit monoklonalen
Antikörpern gefärbten Zellen korrekt messen zu können, wurden zuvor positive (Abb. 3.4 C) und negative (Abb. 3.4 D) Kontrollen eingesetzt.

Die nachfolgenden Messungen des Monozyten-Markers CD14 zeigen beispielhaft die Aufreinigung der CD14-positiven Monozyten von einem CD14-Anteil von 13,37% der ausgewählten Population auf 99,6%. Die Elimination der Lymphozyten in der magnetischen Zellsortierung zeigt sich im Verlust der Lymphozyten-Population (Vergl. Abb. 3.1 und Abb. 3.4 A und B).



Abb. 3.4: Repräsentative FACS-Analyse von Monozyten vor und nach Aufreinigung

PBMCs wurden vor und nach der Monozytenaufreinigung mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene Zell-Marker gefärbt und im Durchflusszytometer untersucht. (A-B) Verteilung der Lymphozyten und Monozyten (vgl. Abb. 3.1) vor (A, R1) und nach (B, R1) der Aufreinigung. R1 ist die durch das Gate ausgewählte und damit betrachtete Zellpopulation. In A sind vor Aufreinigung noch die Monozyten- und die Lymphozytenpopulation zu sehen (vgl. R2 und R3 in Abb. 3.1). In B findet sich nur noch die Monozytenpopulation. Die Zellpopulation R1 aus B wurde im Weiteren untersucht. (C-D) Hierbei wurden positive Kontrollen (CD45; C vertikal) und negative Isotypkontrollen (D) zu Hilfe genommen. (E-F) So konnte die Aufreinigung der CD14-positiven Monozyten durch die magnetische Zellsortierung (E = vorher; F = nachher) bestätigt werden.

3.3. Ausreifung der IFN-DCs an den Tagen 3 und 5 der Inkubation

Die gewonnenen CD14-positiven Monozyten wurden in Nährmedium mit GM-CSF und IFN-α im Wärmeschrank inkubiert. Hierbei änderten die Zellen ihre Eigenschaften, was sich an den auf der Oberfläche exprimierten Markern widerspiegelte. Die Ausgangszellen waren Monozyten und für den Marker CD14 positiv (Abb. 3.3 und 3.4). Über die Zeit der Inkubation entstanden sogenannte IFN-DCs. Dementsprechend fiel der Anteil an gemessenen CD14-positiven Zellen. Um die Entstehung von IFN-DCs nachzuweisen, wurden für DCs charakteristische Oberflächenmarker, wie CD80, CD83 und CD86 im Durchflusszytometer bestimmt (Abb.3.5).

Die Reifung zu IFN-DCs zeigte sich durch den Anstieg des DC Reifungsmarkers CD83, der am 3. Tag bei 5,31% (\pm 4,71%) lag und bis zum 5. Tag auf einen Anteil von 9,28% (\pm 4,33%) an CD83-positiven Zellen stieg.

Der Anteil der für DCs bekannten kostimulierenden Moleküle CD80 und CD86 stieg im Verlauf der Inkubation der Zellen an und spiegelte ebenfalls die Ausreifung der IFN-DCs wider.

Für CD80 wurden am 3. Tag nach Inkubation 86,09% (\pm 5,95%) positive Zellen gemessen. Am 5. Tag der Inkubation lag der Anteil CD80-positiver Zellen bei 85,87% (\pm 15,76%).

Der Marker CD86 verhielt sich ähnlich: Am 3. Tag fanden sich 82,27% (± 9,29%) CD86-positive Zellen, die zum 5. Tag auf 85,67% (± 9,99%) positive Zellen für CD86 stiegen (Abb. 3.5 und 3.6).





Aufgereinigte Monozyten wurden 5 Tage mit IFN- α und GM-CSF inkubiert. Mit Hilfe der Färbung von Reifungsmarkern wurde der Ausreifungsstatus der IFN-DCs im Durchflusszytometer zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Hier dargestellt sind Messungen von Ausreifungsmarkern an den Tagen 3 und 5 der Inkubation. Die Ausreifung der Zellen zeigt sich, neben dem Abfall des Monozyten-Markers CD14, im Anstieg des DC-Reifungsmarkers CD83 und der Expression der kostimulatorischen Moleküle (CD86 und CD80) auf den IFN-DCs; n=2.

Auch bei diesen durchflusszytometrischen Messungen wurden die Zellen zunächst Abhängigkeit der Granularität Größe differenziert. in und Die interessierende Zellpopulation der Monozyten wurde ausgewählt 3.7 A) negative (Abb. 3.6 А und und positive sowie Kontrollen (Abb. 3.6 B und 3.7 B) eingesetzt. Die bereits erwähnten nachfolgenden Messungen (Abb. 3.6 C und D und 3.7 C und D) von CD14, CD83, sowie der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 an den Tagen 3 und 5 der Inkubation zunehmende Ausreifung Zellen zeigten eine der zu IFN-DCs (Abb. 3.6 und Abb. 3.7).





Aufgereinigte Monozyten wurden insgesamt 5 Tage mit IFN-α und GM-CSF inkubiert. Mit Hilfe der Färbung von Reifungsmarkern wurde der Ausreifungsstatus der IFN-DCs im Durchflusszytometer zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. (A) Die Region der Monozyten (R1) wurde untersucht und mit Hilfe von negativen und positiven Isotypkontrollen (B) die weiteren Messungen bewertet. C und D zeigen jeweils IFN-DCs 3 Tage nach Ansatz der Kultur. Gezeigt ist der Anteil an positiven Zellen für den Monozyten-Marker CD14, den DC-Ausreifungsmarker CD83, sowie für die kostimulatorischen Moleküle CD86 und CD80.





Aufgereinigte Monozyten wurden insgesamt 5 Tage mit IFN- α und GM-CSF inkubiert. Mit Hilfe der Färbung von Reifungsmarkern wurde der Ausreifungsstatus der IFN-DCs im Durchflusszytometer zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. (A) Die Region der Monozyten (R1) wurde untersucht und mit Hilfe von negativen und positiven Isotypkontrollen (B) die weiteren Messungen bewertet. C und D zeigen jeweils IFN-DCs 5 Tage nach Ansatz der Kultur. Die IFN-DCs sind reifer, als die in Abb. 3.6 gezeigten IFN-DCs nach 3 Tagen. Dies ist erkennbar an einem niedrigeren Anteil an positiven Zellen mit dem Monozyten-Marker CD14 und einer im Mittel höheren Expression des DC-Ausreifungsmarkers CD83, sowie der kostimulatorischen Moleküle CD 86 und CD80.

3.4. Expression von CD56 auf IFN-DCs

Bei weiteren Untersuchungen von IFN-DCs wurde der bisher für NK-Zellen und NKT-Zellen bekannte Marker CD56 an den Tagen 1, 3 und 5 nach Ansatz der Zellkultur bestimmt. Hierbei zeigte sich ein zunehmender Anteil an CD56-positiven IFN-DCs. Die Expression von CD56 nahm von 23% (\pm 13,41%) an Tag 1 bis auf 55% (\pm 19,67%) an Tag 3 der Kultur signifikant zu (p = 0,0495). An Tag 5 hatte sich der Anteil der CD56-positiven Zellen weiter bis auf 67,8% (\pm 10,91%) erhöht. Der Anstieg von Tag 1 auf 5 war hochsignifikant (p = 0,0009) (Abb. 3.8).





CD14-positive Monozyten wurden über 5 Tage mit IFN- α und GM-CSF inkubiert. Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der Zelloberflächen der dabei entstehenden IFN-DCs zu verschiedenen Zeitpunkten, konnte der für NK- und NKT-Zellen bekannte Marker CD56 nachgewiesen werden. Die Expression von CD56 steigt im zeitlichen Verlauf an. Zwischen Tag 1 und Tag 3 ist der Anstieg an CD56-positiven IFN-DCs signifikant (p = 0,0495), von Tag 1 auf 5 hochsignifikant (p = 0,0009); n=3-5.

3.5. Untersuchung von CD56-positiven und CD56-negativen IFN-DCs

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob es sich bei den CD56-positiven und CD56-negativen Populationen um einen Zelltyp in unterschiedlicher Differenzierung oder um zwei verschiedene Populationen handelt. Hierzu wurden die Zellen mittels Positivselektion in eine CD56-positive (Reinheit: 98,7% \pm 2%, nicht gezeigt) und eine CD56-negative (Reinheit: 80,7% \pm 4%, nicht gezeigt) Population aufgetrennt. Beide Kulturen wurden am 3. Tag der Inkubation mit IFN- α und GM-CSF für weitere 36 Stunden in RPMI-Medium ohne IFN- α und GM-CSF kultiviert.

Nach 36 Stunden war die CD56-positiv-selektionierte Population weiterhin CD56positiv (98,2% \pm 1%, nicht gezeigt). Die ursprünglich CD56-negativ-selektionierte Population wies zu 41,67% (\pm 11,93%) den CD56-Marker auf ihrer Oberfläche auf und zeigte damit einen signifikanten Anstieg (p = 0,0373) (Abb. 3.9).



Abb. 3.9: Prozentualer Anteil der CD56-Expression auf CD56-negativ-selektionierten IFN-DCs nach Isolation und 36-stündiger Inkubation in RPMI-Medium

CD14-positive Monozyten wurden über 3 Tage mit IFN- α und GM-CSF inkubiert. Nach 3 Tagen wurden CD56-negative IFN-DCs (Reinheit 80,7 ± 4%) von CD56-positiven IFN-DCs getrennt und für 36 Stunden in Nährmedium ohne Zugabe von Zytokinen inkubiert. Im Verlauf der 36 Stunden stieg die Expression von CD56 signifikant auf den ursprünglich CD56-negativen Zellen an (p = 0,0373); n=3.

3.6. TNF-α im Überstand der Zellkultur

Im Überstand der in RPMI-Medium mit IFN- α und GM-CSF inkubierten und zu IFN-DCs stimulierten Monozyten wurde mit Hilfe des ELISAs zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Zytokin TNF- α gesucht. Dieses kann eine Rolle bei der Ausreifung von DCs spielen. Die Daten der Messungen werden als Mittelwerte ± Standardfehler (MW ± SEM) angegeben. Am 1. Tag der Inkubation wurde im Mittel eine TNF- α Konzentration von 118,5 pg/ml (± 26,98 pg/ml) Nachdem die Konzentration am 2. aemessen. Tag im Mittel mit 91,44 pg/ml (± 35,36 pg/ml) niedriger war, stieg die TNF- α Konzentration am 3. und 4. Tag mit Konzentrationen von 207,6 pg/ml (± 99,26 pg/ml) und 201,63 pg/ml (± 71,54 pg/ml) deutlich an. Am 5. Tag fiel die Konzentration auf 23,3 pg/ml ab (Abb. 3.10; n=1-6).



Abb. 3.10: Verlauf der TNF-α Konzentration im Überstand des Kulturmediums

Aufgereinigte Monozyten wurden 5 Tage mit IFN- α und GM-CSF inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Konzentration von TNF- α im Überstand mit Hilfe des ELISAs bestimmt. Die an Tag 1 gemessene TNF- α Konzentration stieg bis zum 3. Tag der Inkubation deutlich an, bevor sie zum 5. Inkubationstag stark abfiel. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben; n=1-6.

3.7. IL-1β im Überstand der Zellkultur

Ebenso kann IL-1 β eine Rolle bei der Ausreifung von DCs spielen. Aus diesem Grund wurde im Überstand der kultivierten IFN-DCs mit Hilfe des ELISAs zu verschiedenen Zeitpunkten auch nach diesem Zytokin gesucht. Die Daten der Messungen werden als Mittelwerte ± Standardfehler (MW ± SEM) angegeben. Am 1. Tag der Inkubation wurde eine IL-1 β Konzentration von 30,4 pg/ml gemessen. Von Tag 2 auf Tag 3 der Kultivierung nahm die IL-1 β Konzentration im Mittel von 35,53 pg/ml (± 1,02 pg/ml) auf 21,5 pg/ml (± 5 pg/ml) signifikant ab (p = 0,0381). Am 4. Tag konnte kein IL-1 β nachgewiesen werden (Abb. 3.11; n=1-3).





Aufgereinigte Monozyten wurden 5 Tage mit IFN- α und GM-CSF inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Konzentration von IL-1 β im Überstand mit Hilfe des ELISAs bestimmt. Von Tag 2 auf Tag 3 der Kultivierung nahm die IL-1 β Konzentrationen signifikant ab (p = 0,0381). Die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben; n=1-3.

4. Diskussion

4.1. Generierung von IFN-DCs

DC-Immuntherapien sind ein vielversprechender Ansatz für die entscheidende Ergänzung der Therapie von onkologischen Erkrankungen (Papewalis et al. 2008a). Eine ausreichende *in vitro* Herstellung von DCs ermöglicht erst ihre weitere Erforschung als Therapieform der onkologischen Erkrankungen. In dieser Arbeit wurden neue Aspekte im Rahmen der Generierung von DCs aus Monozyten mit Hilfe von IFN- α und GM-CSF untersucht. Weitere Faktoren, die bei der Ausreifung der IFN-DCs eine Rolle spielen können, wurden nachgewiesen. Santini et al. lieferten mit einer Arbeit die Grundlage für die *in vitro* Herstellung der hier näher untersuchten IFN-DCs (Santini et al. 2000).

Zur Generierung von IFN-DCs müssen zunächst Ausgangszellen gewonnen werden. Als Ausgangszellen wurden in dieser Arbeit CD14-positive Monozyten aus dem peripheren humanen Blut verwendet. In der Literatur sind als mögliche Ausgangszellen für die Generierung von DCs CD34-positive Vorläuferzellen oder Monozyten aus dem peripheren Blut beschrieben.

Reid et al. stellten DCs aus CD34-positiven Vorläuferzellen aus dem Knochenmark her, indem sie diese mit GM-CSF und TNF- α stimulierten (Reid et al. 1992). Eine andere Arbeitsgruppe verwendete CD34-positive Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut (Caux et al. 1992). CD34-positive Progenitorzellen können via Leukapherese auch aus dem peripheren Blut gewonnen werden (Siena et al. 1995). Ein grundsätzliches Problem dieser Methode ist die niedrige Zahl der sich im peripheren Blut befindlichen CD34-positiven Progenitorzellen.

Aufgrund der besseren Verfügbarkeit ist es sinnvoll, die Ausgangszellen für die Generierung von DCs aus dem peripheren Blut zu gewinnen.

Bei der einfachsten und verbreitetsten Möglichkeit DCs *in vitro* zu generieren werden, wie auch in dieser Arbeit, aus dem peripheren Blut gewonnene Monozyten als Ausgangszellen verwendet (Jacobs et al. 2008b). Das humane

Vollblut, als Quelle für die Monozyten, ist einfach und in ausreichender Menge durch Punktion einer peripheren Vene zu gewinnen.

Zur Gewinnung von Monozyten wurden, wie im Teil Material und Methoden beschrieben, die Dichtegradientenzentrifugation (Pertoft et al. 1980; Fluks 1981) und eine negative Selektionierung mit Hilfe von MicroBeads im Rahmen der magnetischen Zellsortierung (Molday et al. 1977; Stanciu et al. 1996) verwendet. Nach der Dichtegradientenzentrifugation sollten, neben Zelltrümmern, lediglich die Lymphozyten- und Monozytenpopulation vorzufinden sein. Die normale Zellen wurde im FACS überprüft Verteilung der und bestätigt (Abb. 3.1 und Abb. 3.2). Die magnetische Zellsortierung wurde angeschlossen, um die für die geplanten Versuche benötigten CD14-positiven Monozyten in möglichst hoher Reinheit von den übrigen Bestandteilen zu separieren. Mit dieser Methode wurde regelmäßig eine Reinheit an CD14-positiven Monozyten um 98,15% (± 1,58%) erzielt, gemessen am Anteil CD14-positiver Zellen im Durchflusszytometer (Abb. 3.3 und 3.4).

In der Literatur sind verschiedene Möglichkeiten der Separation von Monozyten beschrieben.

Dazu zählen, neben der für diese Arbeit verwendeten Dichtegradientenzentrifugation und negativen Selektionierung, die positive Selektionierung im Rahmen der magnetischen Zellsortierung, die Nutzung der Adhärenzfähigkeit von Monozyten an Plastikoberflächen (Koller et al. 1973; Treves et al. 1980), die zentrifugale Elutriation (Lutz et al. 1992), sowie die Separation mithilfe des FACS (Herzenberg et al. 2002; Baumgarth und Roederer 2000).

Ein Aspekt bei der Auswahl des Verfahrens für diese Arbeit war, dass für Stimulationsversuche mit Zytokinen nicht aktivierte Monozyten vorliegen sollen. Bei der positiven Selektionierung im Rahmen der magnetischen Zellsortierung sowie der Zellseparation via FACS kann es durch die jeweilige Antikörperbindung zu einer solchen Aktivierung kommen, weswegen diese Verfahren für diese Arbeit nicht in Frage kamen.

38

Die mehrfach erfolgreiche Anwendung in der Arbeitsgruppe von Prof. Schott mit zufriedenstellenden Reinheitsgraden an Monozyten (Papewalis et al. 2008b; Jacobs et al. 2008a), der möglichen Aktivierung von Zellen bei Adhärenzverfahren sowie der fehlenden Erfahrung und Verfügbarkeit der Elutriation gaben den Ausschlag zu Gunsten der ausgewählten Verfahren.

Die gewonnenen CD14-positiven Monozyten wurden nun in der Zellkultur zu IFN-DCs stimuliert. Dafür wurde ein Protokoll verwendet, in dem die aus peripherem Blut isolierten Monozyten mit IFN- α und GM-CSF inkubiert wurden (Santini et al. 2000).

Verschiedene Arbeiten zeigen Wege auf, wie Monozyten mit unterschiedlichen Zytokinen zu DCs stimuliert werden können. Einen allgemein anerkannten Standard zu Gunsten eines Protokolls gibt es nicht (Schott 2006). Die in den verschiedenen Ansätzen entstandenen DCs unterscheiden sich in phänotypischer und funktioneller Hinsicht voneinander (Jacobs et al. 2008b). In der Literatur finden sich Beispiele für verschiedene Wege der Generierung von DCs, bei denen von der Verwendung von IL-4 und GM-CSF (Sallusto und Lanzavecchia 1994; Romani et al. 1994), IFN- α und GM-CSF (Santini et al. 2000; Paquette et al. 1998), TNF- α und GM-CSF (Chomarat et al. 2003), zusätzlicher Inkubation mit Lipopolysacchariden (LPS) (Iwamoto et al. 2007), IL-15 und GM-CSF (Mohamadzadeh et al. 2001), sowie Toll like Rezeptor (TLR) (Krutzik et al. 2005) berichtet wird.

Die Entscheidung für die Möglichkeit der DC-Generierung mit IFN-α und GM-CSF fiel u.a. durch die vielfach erfolgreiche Anwendung durch die Arbeitsgruppe von Prof. Schott (Jacobs et al. 2008a; Papewalis et al. 2008b). DCs wurden zuvor auch mit Hilfe von IL-4 und GM-CSF generiert (Schott et al. 2000). IL-4-DCs wurden in der Literatur mit IFN-DCs bezüglich verschiedener Aspekte verglichen und untermauerten die bessere Eignung von IFN-DCs für DC-Immuntherapien im Vergleich zu IL-4-DCs.

39

Immunologisch betrachtet ist der Kontakt von Monozyten mit IFN- α im Rahmen von Infektionen und deren Bedeutung für die angeborene und erworbene Immunität physiologischer, als der Kontakt lediglich zu IL-4 (Parlato et al. 2001; Mohty et al. 2003). Durch Stimulation mit IFN- α und GM-CSF steigen u.a. die Ausreifungsmarker CD40 und CD83, sowie die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 schnell und höher an als unter Stimulation mit IL-4, während der Monozyten-Marker CD14 stärker abfällt (Della Bella et al. 2004; Santini et al. 2000; Mohty et al. 2003; Parlato et al. 2001). Die IFN-DCs zeigen also, neben vergleichbarer Fähigkeit zur Antigenaufnahme und deren Verlust bei Reifung, einen reiferen Phänotyp als die IL-4-DCs (Della Bella et al. 2004). Die unreifen IL-4-DCs bilden im Gegensatz zu den IFN-DCs ihren DC-Phänotyp zurück, wenn sie in ein Nährmedium ohne die stimulierenden Zytokine aufgenommen werden (Schuler und Romani 1997; Santini et al. 2000). Papewalis et al. sowie Weitere berichteten von einer stärkeren Induktion der T-Zell Antwort durch reife IFN-DCs als durch reife IL-4-DCs (Papewalis et al. 2008b; Breckpot et al. 2005; Mohty et al. 2003). Korthals et al. verglichen IFN-DCs mit IL-4-DCs, welche durch Zugabe von TNF- α weiter ausreiften und zeigten eine deutlich stärker ausgeprägte eigene zytotoxische Aktivität der IFN-DCs gegen Tumorzellen (Korthals et al. 2007). Dieses Ergebnis ist dahingehend interessant, dass auch hier ein Vorteil von IFN-DCs gegenüber IL-4-DCs im Rahmen von Antitumor-Therapien liegen kann. Abschließend erscheint im Kontext der Immuntherapien die Verwendung von IFN-DCs am aussichtsreichsten.

Das im Protokoll zur Generierung von IFN-DCs verwendete IFN-α ist Vertreter der Typ-1-Interferone und hat ausgeprägte immunregulatorische, antivirale und antitumoröse Eigenschaften (Gutterman 1994; Pfeffer et al. 1998). Die antitumorösen Eigenschaften sind vermittelt durch die Differenzierung der TH1-Subpopulationen, die Erzeugung von CTLs, die Aktivierung von NK-Zellen und die Förderung von T-Zellwachstum und -überleben (Pfeffer et al. 1998; Sun et al. 1998; Marrack et al. 1999; Trinchieri et al. 1978; Kolumam et al. 2005). Es wurde bereits erfolgreich in der Therapie der Chronisch myeloischen Leukämie (*Long-term follow-Up of the italian trial of interferon-alpha versus conventional chemotherapy in chronic myeloid leukemia. The Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia* 1998) und von Non-Hodgkin-Lymphomen (Rohatiner et al. 2005) eingesetzt, sodass möglicherweise gerade Patienten mit diesen Erkrankungen von einer Therapie mit IFN-DCs profitieren (Korthals et al. 2007). IFN- α wird physiologisch in geringen Mengen (Belardelli et al. 1984) im Körper gebildet, während bei mikrobiellen Kontakten größere Mengen produziert werden (Cella et al. 1999; Liu 2005). Es hat eine Funktion bei der Aktivierung von Zellen des angeborenen und des erworbenen Teils des Immunsystems (Biron 2001). Als zelluläre Quelle für die IFN- α -Produktion wurden die plasmazytoiden DCs identifiziert (Siegal et al. 1999; Cella et al. 1999; Izaguirre et al. 2003). Paquette et al. zeigten 1998, dass sich durch eine Kultivierung von Monozyten mit IFN- α und GM-CSF potente antigenpräsentierende DCs entwickeln (Paquette et al. 1998).

Das ebenfalls der Zellkultur zugesetzte GM-CSF stimuliert *in vitro* die Proliferation und Differenzierung von Makrophagen und Granulozyten. Es wurde 1980 von Burgess et al. als Stimulator für Granulozyten und Makrophagen aus Vorläuferzellen im Knochenmark von Mäusen beschrieben (Burgess und Metcalf 1980). Witmer-Pack et al. zeigten später, dass GM-CSF einen wichtigen Faktor für die Reifung von Langerhans Zellen darstellt (Witmer-Pack et al. 1987). Heufler et al. berichteten, dass GM-CSF das Überleben, sowie die stimulatorische Kapazität der Zellen fördert (Heufler et al. 1988). Mittlerweile ist bekannt, dass GM-CSF auch im Rahmen von Entzündungen proinflammatorische Funktionen aufweist (Hamilton und Anderson 2004). GM-CSF scheint auch einen fördernden Einfluss auf die Ausreifung von DCs zu haben. Nach Larsen et al. nimmt die Ausprägung der für die funktionelle Ausreifung von DCs stehenden Oberflächenmarker CD80 und CD86 bei Blockade der GM-CSF-Wirkung ab (Larsen et al. 1992; Larsen et al. 1994).

Die stimulatorische Kapazität von IFN- α , bezogen auf die Ausprägung der kostimulatorischen Moleküle auf IFN-DCs, ist laut einer Arbeit von Santini et al. dosisabhängig. Sie berichteten, dass sich bei der Kultur von Monozyten mit IFN-a und GM-CSF mit einer Konzentration von 100 U/ml IFN- α keine Unterschiede zur alleinigen Kultur mit GM-CSF zeigten, während Dosen im Bereich von 500 bis 1000 die besten Ergebnisse bezüglich der U/ml Ausprägung der kostimulatorischen Moleküle zeigten (Santini et al. 2000). Da die Ausprägung der kostimulatorischen Moleküle ein Reifezeichen der DCs ist und möglichst reife IFN-DCs gewonnen werden sollten, wurden der Zellkultur dieser Arbeit entsprechend 1000 U/ml an IFN- α zugesetzt.

Die isolierten CD14-positiven Monozyten wurden für 5 Tage mit IFN-α und GM-CSF im Wärmeschrank inkubiert, um die Monozyten zu IFN-DCs reifen zu lassen (Jacobs et al. 2008a; Paquette et al. 1998; Santini et al. 2000). An den Tagen 3 und 5 wurden die Zellen bezüglich DC-Ausreifungsmarkern und dem Monozyten-Marker CD14 im Durchflusszytometer untersucht. Hierbei zeigte sich die erwartete Entwicklung der Zellen, nämlich die Ausreifung zu IFN-DCs. Der Anteil an CD14 als Monozyten-Marker fiel, während CD83 als Ausreifungsmarker anstieg (Dauer et al. 2003; Tosi et al. 2004). Die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, welche mit MHC II Molekülen an die Oberfläche transportiert werden (Turley et al. 2000), stiegen ebenfalls wie erwartet an (Papewalis et al. 2008b; Santini et al. 2000).

4.2. CD56-Expression auf IFN-DCs

In weiteren Messungen wurden die IFN-DCs auch auf den Marker CD56 untersucht. CD56 wird auch als NCAM (*neural cell adhesion molecule*) bezeichnet, da es auf neuronalen und neuroendokrinen Tumoren nachgewiesen wurde (Jin et al. 1991). CD56 ist ein bekannter Marker auf NK-Zellen (Robertson und Ritz 1990) und NKT-Zellen (Lu und Negrin 1994), nicht jedoch auf antigenpräsentierenden Zellen wie DCs. In einer Arbeit der Gruppe von Prof. Schott konnte dieser Marker nachgewiesen und zusätzlich gezeigt werden, dass CD56-positive IFN-DCs eine zytolytische Aktivität gegenüber Tumorzellen besitzen. Die zytolytische Aktivität der IFN-DCs konnte in Untersuchungen durch eine Blockade mit TRAIL-Antikörpern unterbunden werden (Papewalis et al. 2008b). Im Kontext der Verbesserung der Therapie Schilddrüsenkarzinoms des medullären bzw. der Entwicklung von DC-Immuntherapien stellen IFN-DCs mit direkter zytolytischer Kapazität gegen Tumorzellen einen interessanten Ansatzpunkt dar.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte CD56 zu verschiedenen Zeitpunkten auf den IFN-DCs nachgewiesen werden (Abb. 3.8). Der Anteil an CD56-positiven Zellen nahm im Verlauf der Ausreifung der IFN-DCs zu. Da der Marker bisher als spezifisch für NK-Zellen und NKT-Zellen galt, kam die Frage auf, ob es sich um zwei unterschiedliche DC-Populationen handelt oder um eine Population in unterschiedlicher Differenzierung.

Um diese Frage zu beantworten, wurden nach drei Tagen Kultivierung von Monozyten mit IFN-α und GM-CSF die CD56-negativen Zellen aus dieser Kultur mit Hilfe einer Positivselektion isoliert. Die nun weiter ohne Zytokine in Nährlösung kultivierten Zellen wurden nach 36 Stunden im Durchflusszytometer auf CD56 untersucht. Dabei zeigte sich ein Anstieg des Anteils an CD56-positiven IFN-DCs (Abb.3.9). Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass es sich am ehesten um eine DC-Population in unterschiedlicher Differenzierung handelt.

Weitere Untersuchungen dieser Zellen durch die Arbeitsgruppe von Prof. Schott untermauern diese Einschätzung. Die CD56-positiven und CD56-negativen IFN-DCs unterscheiden sich in ihrer phagozytotischen Kapazität und ihrer Fähigkeit T-Zellen zu stimulieren kaum. Morphologische Untersuchungen im Elektronenmikroskop und durch die Durchflusszytometrie zeigten ebenfalls keine relevanten Unterschiede der Zellen (Jacobs et al. 2008a).

43

4.3. TNF-α und IL-1β im Überstand der Zellkultur

Entsprechend der Aufgabenstellung dieser Arbeit wurden Überlegungen angestellt, welche weiteren Faktoren eine Rolle bei der Ausreifung der IFN-DCs spielen können.

Möglicherweise befinden sich im Kulturansatz weitere, nicht von exogen zugegebene Faktoren, die die Ausreifung fördern. Hierfür kommen z.B. Zytokine in Frage.

Zytokine sind Peptide bzw. Proteine und werden von fast allen kernhaltigen Zellen synthetisiert. Als Mediatoren lösen sie, durch Bindung an Membranrezeptoren, verschiedene zytokinspezifische Antworten ihrer Zielzellen aus (Oppenheim 2001). Die Familien des Tumor-Nekrose-Faktors und der Interleukine zählen zu den Zytokinen. Für Mitglieder dieser Familien, TNF- α und IL-1 β , ist eine fördernde Wirkung auf die Reifung von DCs bekannt (Sallusto et al. 1995; Jonuleit et al. 1996; Jonuleit et al. 1997; Cumberbatch et al.; 1997 Girolomoni und Ricciardi-Castagnoli 1997), weswegen diese Zytokine in den Fokus der Untersuchungen gerückt sind. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob diese Zytokine, ohne dass sie der Zellkultur von exogen zugegeben wurden, eine Rolle bei der Ausreifung der IFN-DCs spielen.

In der Literatur sind darüber hinaus verschiedene Zytokine beschrieben, die im Rahmen von Protokollen eine Ausreifung der DCs fördern.

Neben der für diese Arbeit verwendeten Inkubation von Monozyten mit IFN- α und GM-CSF, wurden z.B. Zytokine wie IL-4, IL-15 und TNF- α in diesen Protokollen eingesetzt (Jacobs et al. 2008b). Dabei fiel auf, dass zur Generierung oder weiteren Ausreifung von DCs häufig TNF- α alleine oder in Zytokinmischungen verwendet wurde (Reid et al. 1992; Caux et al. 1992; Jonuleit et al. 1997; Luft et al. 1998; Brunner et al. 2000; Chomarat et al. 2003; Mailliard et al. 2004; Korthals et al. 2007; Iwamoto et al. 2007).

Die Förderung der Ausreifung von DCs durch TNF- α wurde in den 90er Jahren von Jonuleit et al. sowie 2002 von Schuler-Thurner et al. beschrieben (Jonuleit et

al. 1997; Schuler-Thurner et al. 2002). IL-4 generierte DCs haben einen unreifen Phänotyp (Zhou und Tedder 1995) und konnten mit TNF- α zur weiteren Ausreifung gebracht werden (Royer et al. 2006). Eine weitere Ausreifung von DCs durch TNF- α beobachteten auch Mohamadzadeh et al. bei IL-15-DCs (Mohamadzadeh et al. 2001).

Durch diese Datenlage untermauert, könnte demnach TNF- α , vorausgesetzt es liegt im Überstand der Zellkultur vor, einen additiven fördernden Effekt auf die Ausreifung der IFN-DCs haben. Daher wurde gezielt nach diesem Zytokin im Überstand der Zellkultur zu verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe des ELISAs gesucht.

TNF- α konnte zu allen Zeitpunkten der Messung in unterschiedlicher Konzentration nachgewiesen werden. Auffällig war der deutliche Konzentrationsanstieg von TNF- α am 3. und 4. Tag der Inkubation, bevor sie am 5. Tag wieder abnahm. Die gemessenen Konzentrationen von TNF- α sind an Tag 3 und 4 als hoch einzuordnen. Michie zeigte in einer älteren Arbeit einen TNF- α -peak auf Applikation von E. coli-Endotoxin nach 90-180 Minuten von 270 ± 70 pg/ml, während nach Verabreichung einer Kochsalzlösung lediglich 35 ± 5 pg/ml TNF- α zu messen waren (Michie et al. 1988). Diese Konzentrationen, sowie die in dieser Arbeit gemessenen Werte für TNF- α , erreichen jedoch nicht die Konzentrationen die in verschiedenen Arbeiten zur Förderung der DC-Ausreifung verwendet wurden. Dort wurden Konzentrationen im Bereich von 5 – 100 ng/ml TNF- α eingesetzt (Jonuleit et al. 1997; Luft et al. 1998; Brunner et al. 2000; Mohamadzadeh et al. 2001; Chomarat et al. 2003; Royer et al. 2006; Iwamoto et al. 2007).

TNF- α ist ein Polypeptid, welches bei Infektionen, Entzündungen und Tumorerkrankungen vor allem von Monozyten und Makrophagen ausgeschüttet wird (Miller et al. 1993; Tracey und Cerami 1994). Namensgebend waren die von Carswell 1975 entdeckten, von TNF- α induzierten hämorrhagischen Nekrosen bei Versuchen im Tiermodell (Carswell et al. 1975). Es ist bekannt, dass TNF- α eines

45

der ersten freigesetzten Zytokine bei inflammatorischen Prozessen ist, welches u.a. die Ausschüttung weiterer Zytokine induziert (Kriegler et al. 1988; Andersson et al. 1992). Die Wirkungen von TNF- α sind über Bindung an zwei verschiedene Rezeptoren vermittelt, TNF-R1 und TNF-R2 (Vandenabeele et al. 1995). In neuen Untersuchungen im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass TNF-R1 der vermittelnde Rezeptor für die Reifung von DCs ist (Ding et al. 2011). Möglicherweise könnte also dieser Rezeptor, nachdem das im Überstand befindliche TNF- α angedockt hat, eine Signalkaskade induzieren, die die Reifung der DCs fördert.

TNF-α hat auch regulatorische Funktionen auf Zellen des Immunsystems. Monozyten und Makrophagen werden chemotaktisch angelockt (Ming et al. 1987) und die Expression von Adhäsionsmolekülen stimuliert (Roach et al. 2002). Die phagozytotische Aktivität von Granulozyten (Shalaby et al. 1985) und Makrophagen (Bekker et al. 2001) wird gesteigert und die Differenzierung und Aktivität von T-Lymphozyten (Scheurich et al. 1987) und B-Lymphozyten (Aversa et al. 1993) vermittelt. Zudem regt es laut Munker et al. die Produktion des Wachstumsfaktors GM-CSF an (Munker et al.).

In verschiedenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass Patienten mit Tumorerkrankungen (Balkwill et al. 1987) und verschiedenen Infektionskrankheiten (Bekker et al. 2001; Lähdevirta et al. 1988; Blanchard et al. 1987; Waage et al. 1987; Scuderi et al. 1986) erhöhte TNF- α Spiegel aufwiesen. Ebenso konnten bei Tumorerkrankungen auch erhöhte TNF- α Konzentrationen in Makrophagen nachgewiesen werden (Aderka et al. 1985; Stovroff et al. 1989). Diese Ergebnisse untermauern eine potentielle Wichtigkeit dieses Zytokins bei der Bekämpfung von Tumorerkrankungen.

Unklar ist, woher das im Überstand gemessene TNF- α stammt. Neben Monozyten und Makrophagen sind auch viele andere Zellen des Körpers in der Lage TNF- α auszuschütten. Dazu zählen z.B. Lymphozyten (Goldfeld et al. 1991), Granulozyten, Endothelzellen (Wilkinson und Edwards 1991), Synovialzellen (Brennan et al. 1992), Mastzellen (Diaconu et al. 2007; Benoist und Mathis), Fibroblasten, Astrozyten (Chung und Benveniste 1990), Lipozyten und Herzmuskelzellen (Tracey und Cerami 1994). Da diese Zellen nicht in der Zellkultur vorliegen, scheiden sie als Quellen für TNF- α im Rahmen dieser Arbeit aus. Weiterhin ist gezeigt worden, dass DCs TNF- α ausschütten können (Stuart et al. 2002). Es ist also denkbar, dass die in der Zellkultur befindlichen DCs TNF- α produzieren und sich damit selber mit TNF- α als additiven Faktor in ihrer Ausreifung stimulieren.

Bekannt ist, dass TNF- α ausgeschüttet wird, wenn LPS (oder die an Protein gebundene Form, LPB) an den Monozyten-Marker CD14 bindet. Der Zellkultur wurde allerdings kein LPS als potentieller Stimulus von exogen zugegeben. Wird CD14 blockiert kommt es laut Wright et al. zu keiner Ausschüttung von TNF- α (Wright et al. 1990). Die in der Zellkultur befindlichen DCs verlieren mit zunehmender Ausreifung das Oberflächenmolekül CD14 (Abb. 3.5). Sollte TNF- α durch die CD14-positiven Zellen produziert worden sein, würde man an den ersten Tagen der Inkubation, entsprechend der größeren Menge an CD14-positiven Zellen, höhere TNF- α Konzentrationen als an den späteren Tagen erwarten. Auf der anderen Seite würde im Falle einer bakteriellen Verunreinigung die Belastung der Kultur mit LPS über die Zeit der Inkubation zunehmen. Die einzelnen Arbeitsschritte von Zellgewinnung, über Zellkultur bis hin zur Messung wurden unter sterilen Bedingungen vorgenommen, sodass eine bakterielle Verunreinigung des Kulturansatzes, und eine damit einhergehende Stimulation der Zellen durch LPS, unwahrscheinlich erscheinen.

TNF- α hat eine kurze Plasma-Halbwertszeit im Minutenbereich (Beutler et al. 1985). Die Überstände wurden beim Ernten der Zellen aliquotiert und unmittelbar eingefroren, sodass es zu keiner relevanten Veränderung der Konzentration gekommen sein sollte. Durch die kurze Halbwertszeit des TNF- α müsste der Zeitpunkt der Ausschüttung des Zytokins kurz vor der Ernte liegen. In der Literatur wurde ein signifikanter Anstieg von TNF- α 4 bis 8 Stunden nach

47

Kontakt mit LPS beschrieben (Focà et al. 1998). Auf Applikation von E. coli-Endotoxin beschreiben Michie et al. den Haupt*peak* von TNF-α nach 90 bis 180 Minuten. Da diese Mechanismen hier jedoch nicht anzunehmen sind, bleiben Ursache und Zeitpunkt der Ausschüttung des TNF-α unklar.

Die oben beschriebene Fähigkeit von DCs, TNF- α zu produzieren, wurde von Stuart et al. beobachtet, wenn DCs apoptotische Zellen aufgenommen haben (Stuart et al. 2002). Die Konstellation, dass Zellen in der Zellkultur apoptotisch werden und von ebenfalls in der Zellkultur befindlichen IFN-DCs aufgenommen werden ist hier denkbar und könnte der Mechanismus zur Produktion von TNF- α im Rahmen der Messungen sein.

Ein weiteres Zytokin, nach dem im Überstand der Ansätze gesucht wurde, ist IL-1 β . IL-1 β gehört zur IL-1 Genfamilie und wird bei inflammatorischen Prozessen ausgeschüttet (Nicklin et al. 2002). Ausgeschüttet wird IL-1 β von verschiedenen Zellen, u.a. Monozyten und Makrophagen. De Groote et al. berichteten von der IL-1 β -Produktion durch PBMCs (de Groote et al. 1992). Girolomoni et al. beschrieben, dass IL-1 β bei Reifung von DCs freigesetzt werden kann und auch die Reifung der DCs fördert (Girolomoni und Ricciardi-Castagnoli 1997). Auch Sallusto et al. berichteten von einer fördernden Wirkung von IL-1 β auf die DC-Reifung (Sallusto et al. 1995). Es ist daher denkbar, dass IL-1 β in der Zellkultur vorliegt und die Ausreifung der IFN-DCs fördert, ohne dass IL-1 β exogen zugegeben wurde.

Im Rahmen der Untersuchungen dieser Arbeit konnte IL-1 β an den Tagen 1, 2 und 3 nach Inkubation der Zellen im Überstand durch einen ELISA nachgewiesen werden. Die Messungen an Tag 4 waren allesamt negativ für IL-1 β . Die gemessenen Werte lagen zwischen 16,5 pg/ml und 36,7 pg/ml. Die höheren Werte wurden in den ersten beiden Tagen der Inkubation gemessen, während die Konzentration am dritten Tag abfiel, bis am vierten Tag kein IL-1 β mehr messbar war.

48

Die Konzentration von IL-1β im Serum gesunder Menschen liegt laut Dinarello et al., abhängig von der Messmethode bei den meisten kommerziell beziehbaren ELISAs, unter 5 pg/ml, während sie, z.B. bei einer Sepsis, in den Nanogramm-Bereich ansteigen kann (Dinarello 2005b). Die hier gemessenen Konzentrationen sind daher am ehesten als nur leicht erhöht einzuordnen, was bei gesunden Probanden als Blutspendern möglicherweise als Reaktion der Zellen auf die Manipulationen im Rahmen der Versuchsbedingungen gedeutet werden kann. Ebenso ist denkbar, dass durch Zelldefekte IL-1β freigesetzt wird.

Der Zeitpunkt der gemessenen höheren Werte an Tag 1 und 2 deutet darauf hin, dass als Quelle für IL-1 β am ehesten die als Ausgangszellen vorliegenden Monozyten verantwortlich sind. Zu Beginn der Kultivierung, als die höheren Werte für IL-1 β gemessen wurden, befanden sich mehr Monozyten als DCs in der Kultur. Im Laufe der Kultivierung entstanden IFN-DCs, während an Tag 3 geringere Werte an IL-1 β gemessen wurden und am 4. Tag kein IL-1 β mehr nachgewiesen werden konnte. In diesem Zusammenhang wurde in mehreren Arbeiten gezeigt, dass für die Ausschüttung von IL-1 β durch DCs eine starke Stimulation, z.B. mit hohen Dosen LPS, die hier nicht vorlag, notwendig war (Cumberbatch et al. 1998; Schreiber et al. 1992; Morelli et al. 2001). IL-1 β liegt also in der Zellkultur als möglicher additiver Faktor vor und kann die Ausreifung der IFN-DCs fördern. Die eher nur leicht erhöhten Konzentrationen lassen eine entscheidende Verstärkung der Reifung der IFN-DCs unwahrscheinlich erscheinen.

4.4. Fazit und Ausblick

In der hier vorliegenden Dissertation konnte der für NK-Zellen und NKT-Zellen charakteristische Marker CD56 auf IFN-DCs nachgewiesen werden. Durch eine Nachinkubation der CD56-negativen Zellen, ohne Zugabe stimulierender Zytokine, konnte gezeigt werden, dass es sich bei den CD56-positiven und CD56-negativen Zellen am ehesten um eine Population in unterschiedlicher Differenzierung handelt. Der Marker CD56 weist auf eine eigene zytolytische Potenz der IFN-DCs hin. Dies kann ein Baustein in der Erforschung effektiver DCbasierter Immuntherapien von Tumorerkrankungen sein.

In weiteren Untersuchungen dieser Arbeit konnte im Rahmen der Ausreifung von mit GM-CSF und IFN- α stimulierten Monozyten zu IFN-DCs gezeigt werden, dass mit TNF- α und IL-1 β zwei Faktoren im Überstand des Kulturmediums vorliegen, die als additive Faktoren zu den zugegebenen Zytokinen die Ausreifung der Monozyten zu IFN-DCs fördern können. Bezogen auf die Konzentration der vorliegenden additiven Faktoren ist eine Förderung der Ausreifung der IFN-DCs durch TNF- α wahrscheinlicher, als durch IL-1 β .

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der gemessenen additiven Faktoren mit den höheren Werten von IL-1 β an den Tagen 1 und 2, sowie den höheren Werten von TNF- α an den Tagen 3 und 4, könnte IL-1 β möglicherweise durch Stimulation der Zellen die Steigerung der Ausschüttung von TNF- α ausgelöst haben. Die Aufeinanderfolge der Abläufe könnte dann folgendermaßen aussehen: Die inkubierten Monozyten setzen wegen Zellstress unter den Versuchsbedingungen oder durch Zelldefekte IL-1ß in leicht erhöhter Konzentration frei, die ausreicht, um nachfolgend eine erhöhte Freisetzung von TNF- α zu stimulieren, welches wiederum die Ausreifung der IFN-DCs fördert. Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um die hypothetischen Abläufe zu klären und damit das Wissen über die Generierung von IFN-DCs und ihre Interaktionen mit Zytokinen zu erweitern.

Als mögliche weitere Untersuchungen könnten TNF- α und IL-1 β einzeln oder zeitgleich in der Kultur von IFN-DCs durch spezifische Antikörper geblockt werden. Dies würde die Wirkung der additiven Faktoren unterbinden. Im nächsten Schritt kann untersucht werden, ob sich die IFN-DCs, auf die additive Faktoren nicht wirken konnten, von parallel angesetzten IFN-DCs, auf die additive Faktoren einzeln oder gemeinsam gewirkt haben, unterscheiden. Somit könnte die vermutete stimulierende Wirkung von TNF- α und IL-1 β gestützt werden und die bezüglich der Ausreifung günstigste Kombination gefunden werden. Zudem wird bei Blockade von IL-1 β die mögliche Steigerung der Ausschüttung von TNF- α durch IL-1 β untersucht.

Weiterhin wäre die Untersuchung der Quelle der gefundenen Zytokine TNF- α und IL-1 β interessant. Es wäre denkbar die Quelle durch eine intrazytoplasmatische Färbung der beiden Zytokine in den Zellen der Kultur nachzuweisen. Hierfür kommen in erster Linie die Monozyten als Ausgangszellen, sowie die generierten IFN-DCs infrage. Aber auch an den Wänden des Kulturgefäßes adhärente Zellen, sowie tote Zellen könnten eine Quelle sein.

Untersucht werden könnten auch weitere additive Faktoren, für die eine Förderung der Ausreifung von DCs bekannt ist, wie beispielhaft IL-4 (Sallusto und Lanzavecchia 1994; Romani et al. 1994), IL-15 (Mohamadzadeh et al. 2001) und TLR (Krutzik et al. 2005).

Die hier vorliegende Arbeit zeigt, dass endogene Zytokine im Kulturansatz potentiell die IFN-DCs beeinflussen und damit einen wichtigen Faktor bei ihrer Herstellung darstellen. Von Bedeutung ist dies im Rahmen von DC-Immuntherapien, für deren Entwicklung die Herstellung von DCs in ausreichender Menge und Qualität notwendig ist. Durch die weitere Erforschung dieser Interaktionen ist eine Optimierung der Herstellung von IFN-DCs zu erwarten, da der Einfluss der Zytokine besser berücksichtigt werden kann.

5. Literaturverzeichnis

Long-term follow-Up of the italian trial of interferon-alpha versus conventional chemotherapy in chronic myeloid leukemia. The Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia (1998). In: *Blood* 92 (5), S. 1541–1548.

Aderka, D.; Fisher, S.; Levo, Y.; Holtmann, H.; Hahn, T.; Wallach, D. (1985): Cachectin/tumournecrosis-factor production by cancer patients. In: *Lancet* 2 (8465), S. 1190.

Aggarwal, Bharat B. (2003): Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. In: *Nat. Rev. Immunol.* 3 (9), S. 745–756.

Albert, M. L.; Sauter, B.; Bhardwaj, N. (1998): Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. In: *Nature* 392 (6671), S. 86–89.

Andersson, J.; Nagy, S.; Björk, L.; Abrams, J.; Holm, S.; Andersson, U. (1992): Bacterial toxin-induced cytokine production studied at the single-cell level. In: *Immunol. Rev.* 127, S. 69–96.

Ashley, D. M.; Faiola, B.; Nair, S.; Hale, L. P.; Bigner, D. D.; Gilboa, E. (1997): Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with tumor extracts or tumor RNA induce antitumor immunity against central nervous system tumors. In: *J. Exp. Med.* 186 (7), S. 1177–1182.

Aversa, G.; Punnonen, J.; Vries, J. E. de (1993): The 26-kD transmembrane form of tumor necrosis factor alpha on activated CD4+ T cell clones provides a costimulatory signal for human B cell activation. In: *J. Exp. Med.* 177 (6), S. 1575–1585.

Avrameas, S.; Guilbert, B. (1971): A method for quantitative determination of cellular immunoglobulins by enzyme-labeled antibodies. In: *Eur. J. Immunol.* 1 (5), S. 394–396

Balkwill, F.; Osborne, R.; Burke, F.; Naylor, S.; Talbot, D.; Durbin, H. et al. (1987): Evidence for tumour necrosis factor/cachectin production in cancer. In: *Lancet* 2 (8570), S. 1229–1232.

Banchereau, J.; Steinman, R. M. (1998): Dendritic cells and the control of immunity. In: *Nature* 392 (6673), S. 245–252.

Banchereau, J.; Briere, F.; Caux, C.; Davoust, J.; Lebecque, S.; Liu, Y. J. et al. (2000): Immunobiology of dendritic cells. In: *Annu. Rev. Immunol.* 18, S. 767–811.

Baud, V.; Karin, M. (2001): Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. In: *Trends Cell Biol.* 11 (9), S. 372–377.

Baumgarth, N.; Roederer, M. (2000): A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. In: *J. Immunol. Methods* 243 (1-2), S. 77–97.

Bekker, L. G.; Freeman, S.; Murray, P. J.; Ryffel, B.; Kaplan, G. (2001): TNF-alpha controls intracellular mycobacterial growth by both inducible nitric oxide synthase-dependent and inducible nitric oxide synthase-independent pathways. In: *J. Immunol.* 166 (11), S. 6728–6734.

Belardelli, F.; Vignaux, F.; Proietti, E.; Gresser, I. (1984): Injection of mice with antibody to interferon renders peritoneal macrophages permissive for vesicular stomatitis virus and encephalomyocarditis virus. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81 (2), S. 602–606.

Benoist, Christophe; Mathis, Diane: Mast cells in autoimmune disease. In: *Nature* 420 (6917), S. 875–878.

Beutler, B. A.; Milsark, I. W.; Cerami, A. (1985): Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo. In: *J. Immunol* 135 (6), S. 3972–3977.

Biron, C. A. (2001): Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look. In: *Immunity* 14 (6), S. 661–664.

Blanchard, D. K.; Djeu, J. Y.; Klein, T. W.; Friedman, H.; Stewart, W. E. (1987): Induction of tumor necrosis factor by Legionella pneumophila. In: *Infect. Immun.* 55 (2), S. 433–437.

Breckpot, Karine; Corthals, Jurgen; Bonehill, Aude; Michiels, Annelies; Tuyaerts, Sandra; Aerts, Cindy et al. (2005): Dendritic cells differentiated in the presence of IFN-{beta} and IL-3 are potent inducers of an antigen-specific CD8+ T cell response. In: *J. Leukoc. Biol.* 78 (4), S. 898–908.

Brennan, F. M.; Maini, R. N.; Feldmann, M. (1992): TNF alpha--a pivotal role in rheumatoid arthritis? In: *Br. J. Rheumatol.* 31 (5), S. 293–298.

Brunner, C.; Seiderer, J.; Schlamp, A.; Bidlingmaier, M.; Eigler, A.; Haimerl, W. et al. (2000): Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo. In: *J. Immunol.* 165 (11), S. 6278–6286.

Burgess, A. W.; Metcalf, D. (1980): The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. In: *Blood* 56 (6), S. 947–958.

Carswell, E. A.; Old, L. J.; Kassel, R. L.; Green, S.; Fiore, N.; Williamson, B. (1975): An endotoxininduced serum factor that causes necrosis of tumors. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72 (9), S. 3666– 3670.

Caux, C.; Dezutter-Dambuyant, C.; Schmitt, D.; Banchereau, J. (1992): GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. In: *Nature* 360 (6401), S. 258–261.

Caux, C.; Massacrier, C.; Vanbervliet, B.; Dubois, B.; van Kooten, C.; Durand, I.; Banchereau, J. (1994a): Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. In: *J. Exp. Med.* 180 (4), S. 1263–1272.

Caux, C.; Vanbervliet, B.; Massacrier, C.; Azuma, M.; Okumura, K.; Lanier, L. L.; Banchereau, J. (1994b): B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. In: *J. Exp. Med.* 180 (5), S. 1841–1847.

Cella, M.; Jarrossay, D.; Facchetti, F.; Alebardi, O.; Nakajima, H.; Lanzavecchia, A.; Colonna, M. (1999): Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. In: *Nat. Med.* 5 (8), S. 919–923.

Chan, Camie W.; Crafton, Emily; Fan, Hong-Ni; Flook, James; Yoshimura, Kiyoshi; Skarica, Mario et al. (2006): Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. In: *Nat. Med.* 12 (2), S. 207–213.

Chen, C. H.; Wu, T. C. (1998): Experimental vaccine strategies for cancer immunotherapy. In: *J. Biomed. Sci.* 5 (4), S. 231–252.

Chomarat, Pascale; Dantin, Carole; Bennett, Lynda; Banchereau, Jacques; Palucka, A. Karolina (2003): TNF skews monocyte differentiation from macrophages to dendritic cells. In: *J. Immunol.* 171 (5), S. 2262–2269.

Chung, I. Y.; Benveniste, E. N. (1990): Tumor necrosis factor-alpha production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IL-1 beta. In: *J. Immunol.* 144 (8), S. 2999–3007.

Cumberbatch, M.; Dearman, R. J.; Kimber, I. (1997): Interleukin 1 beta and the stimulation of Langerhans cell migration: comparisons with tumour necrosis factor alpha. In: *Arch. Dermatol. Res* 289 (5), S. 277–284.

Cumberbatch, M.; Dearman, R. J.; Kimber, I. (1998): Characteristics and regulation of the expression on interleukin 1 receptors by murine Langerhans cells and keratinocytes. In: *Arch. Dermatol. Res* 290 (12), S. 688–695.

Dauer, Marc; Pohl, Katrin; Obermaier, Bianca; Meskendahl, Tobias; Röbe, Julian; Schnurr, Max et al. (2003): Interferon-alpha disables dendritic cell precursors: dendritic cells derived from interferon-

alpha-treated monocytes are defective in maturation and T-cell stimulation. In: *Immunology* 110 (1), S. 38–47.

Dave, Sandeep S.; Wright, George; Tan, Bruce; Rosenwald, Andreas; Gascoyne, Randy D.; Chan, Wing C. et al. (2004): Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. In: *N. Engl. J. Med.* 351 (21), S. 2159–2169.

Della Bella, Silvia; Nicola, Stefania; Riva, Antonio; Biasin, Mara; Clerici, Mario; Villa, Maria Luisa (2004): Functional repertoire of dendritic cells generated in granulocyte macrophage-colony stimulating factor and interferon-alpha. In: *J. Leukoc. Biol.* 75 (1), S. 106–116.

Diaconu, Nicolae-Costin; Kaminska, Renata; Naukkarinen, Anita; Harvima, Rauno J.; Nilsson, Gunnar; Harvima, Ilkka T. (2007): Increase in CD30 ligand/CD153 and TNF-alpha expressing mast cells in basal cell carcinoma. In: *Cancer Immunol. Immunother*. 56 (9), S. 1407–1415.

Dinarello, C. A. (2005a): Blocking IL-1 in systemic inflammation. In: *Journal of Experimental Medicine* 201 (9), S. 1355–1359.

Dinarello, Charles A. (2005b): Interleukin-1beta. In: Crit. Care Med 33 (12 Suppl), S. S460-2.

Ding, Xilai; Yang, Wei; Shi, Xiaodong; Du, Peishuang; Su, Lishan; Qin, Zhihai et al. (2011): TNF receptor 1 mediates dendritic cell maturation and CD8 T cell response through two distinct mechanisms. In: *J. Immunol.* 187 (3), S. 1184–1191.

Eigler, A.; Sinha, B.; Hartmann, G.; Endres, S. (1997): Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. In: *Immunol. Today* 18 (10), S. 487–492.

Engvall, E.; Perlmann, P. (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. In: *Immunochemistry* 8 (9), S. 871–874.

Farag, Sherif S.; Caligiuri, Michael A. (2006): Human natural killer cell development and biology. In: *Blood Rev* 20 (3), S. 123–137.

Fearon, Kenneth C.; Voss, Anne C.; Hustead, Deborah S. (2006): Definition of cancer cachexia: effect of weight loss, reduced food intake, and systemic inflammation on functional status and prognosis. In: *Am. J. Clin. Nutr.* 83 (6), S. 1345–1350.

Fernandez, N. C.; Lozier, A.; Flament, C.; Ricciardi-Castagnoli, P.; Bellet, D.; Suter, M. et al. (1999): Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. In: *Nat. Med.* 5 (4), S. 405–411.

Fields, R. C.; Shimizu, K.; Mulé, J. J. (1998): Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (16), S. 9482–9487.

Finn, Olivera J. (2008): Cancer immunology. In: N. Engl. J. Med. 358 (25), S. 2704–2715.

Fluks, A. J. (1981): Three-step isolation of human blood monocytes using discontinuous density gradients of Percoll. In: *J. Immunol. Methods* 41 (2), S. 225–233.

Focà, A.; Berlinghieri, M. C.; Barreca, G. S.; Placanica, P. M.; Diana, R.; Liberto, M. C.; Matera, G. (1998): Kinetics of IL-8, MIP-1 alpha, TNF alpha, IL-1 beta, IL-1ra and IL-10 in human whole blood samples triggered by smooth and rough LPS. In: *New Microbiol.* 21 (2), S. 123–130.

Franzke, Anke (2006): The role of G-CSF in adaptive immunity. In: *Cytokine Growth Factor Rev.* 17 (4), S. 235–244.

Galon, Jérôme; Costes, Anne; Sanchez-Cabo, Fatima; Kirilovsky, Amos; Mlecnik, Bernhard; Lagorce-Pagès, Christine et al. (2006): Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. In: *Science* 313 (5795), S. 1960–1964.

Germain, R. N. (1994): MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. In: *Cell* 76 (2), S. 287–299.

Girolomoni, G.; Ricciardi-Castagnoli, P. (1997): Dendritic cells hold promise for immunotherapy. In: *Immunol. Today* 18 (3), S. 102–104.

Goldfeld, A. E.; Strominger, J. L.; Doyle, C. (1991): Human tumor necrosis factor alpha gene regulation in phorbol ester stimulated T and B cell lines. In: *J. Exp. Med.* 174 (1), S. 73–81.

Gong, J.; Chen, D.; Kashiwaba, M.; Kufe, D. (1997): Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. In: *Nat. Med.* 3 (5), S. 558–561.

Griffiths, G. M. (1995): The cell biology of CTL killing. In: Curr. Opin. Immunol. 7 (3), S. 343-348.

Groote, D. de; Zangerle, P. F.; Gevaert, Y.; Fassotte, M. F.; Beguin, Y.; Noizat-Pirenne, F. et al. (1992): Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. In: *Cytokine* 4 (3), S. 239–248.

Gutterman, J. U. (1994): Cytokine therapeutics: lessons from interferon alpha. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (4), S. 1198–1205.

Hamilton, John A.; Anderson, Gary P. (2004): GM-CSF Biology. In: Growth Factors 22 (4), S. 225-231.

Hehlgans, Thomas; Pfeffer, Klaus (2005): The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. In: *Immunology* 115 (1), S. 1–20.

Herzenberg, Leonard A.; Parks, David; Sahaf, Bita; Perez, Omar; Roederer, Mario; Herzenberg, Leonore A. (2002): The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. In: *Clin. Chem.* 48 (10), S. 1819–1827.

Heufler, C.; Koch, F.; Schuler, G. (1988): Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. In: *J. Exp. Med.* 167 (2), S. 700–705.

Hsu, F. J.; Benike, C.; Fagnoni, F.; Liles, T. M.; Czerwinski, D.; Taidi, B. et al. (1996): Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. In: *Nat. Med.* 2 (1), S. 52–58.

Inaba, K.; Young, J. W.; Steinman, R. M. (1987): Direct activation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells. In: *J. Exp. Med.* 166 (1), S. 182–194.

Iwamoto, Sanju; Iwai, Shin-ichi; Tsujiyama, Kazuko; Kurahashi, Chika; Takeshita, Kumiko; Naoe, Michio et al. (2007): TNF-alpha drives human CD14+ monocytes to differentiate into CD70+ dendritic cells evoking Th1 and Th17 responses. In: *J. Immunol.* 179 (3), S. 1449–1457.

Izaguirre, Alexander; Barnes, Betsy J.; Amrute, Sheela; Yeow, Wen-Shuz; Megjugorac, Nicholas; Dai, Jihong et al. (2003): Comparative analysis of IRF and IFN-alpha expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. In: *J. Leukoc. Biol.* 74 (6), S. 1125–1138.

Jacobs, B.; Wuttke, M.; Papewalis, C.; Fenk, R.; Stüssgen, C.; Baehring, T. et al. (2008a): Characterization of monocyte-derived IFNalpha-generated dendritic cells. In: *Horm. Metab. Res.* 40 (2), S. 117–121.

Jacobs, B.; Wuttke, M.; Papewalis, C.; Seissler, J.; Schott, M. (2008b): Dendritic cell subtypes and in vitro generation of dendritic cells. In: *Horm. Metab. Res.* 40 (2), S. 99–107.

Janeway, C. A. MurphyK Travers P. Walport M. (2009): Immunologie. 7. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Jego, Gaetan; Palucka, A. Karolina; Blanck, Jean-Philippe; Chalouni, Cecile; Pascual, Virginia; Banchereau, Jacques (2003): Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. In: *Immunity* 19 (2), S. 225–234.

Jin, L.; Hemperly, J. J.; Lloyd, R. V. (1991): Expression of neural cell adhesion molecule in normal and neoplastic human neuroendocrine tissues. In: *Am. J. Pathol* 138 (4), S. 961–969.

Jonuleit, H.; Knop, J.; Enk, A. H. (1996): Cytokines and their effects on maturation, differentiation and migration of dendritic cells. In: *Arch. Dermatol. Res.* 289 (1), S. 1–8.

Jonuleit, H.; Kühn, U.; Müller, G.; Steinbrink, K.; Paragnik, L.; Schmitt, E. et al. (1997): Proinflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. In: *Eur. J. Immunol.* 27 (12), S. 3135–3142.

Kadowaki, N.; Antonenko, S.; Ho, S.; Rissoan, M. C.; Soumelis, V.; Porcelli, S. A. et al. (2001): Distinct cytokine profiles of neonatal natural killer T cells after expansion with subsets of dendritic cells. In: *J. Exp. Med.* 193 (10), S. 1221–1226.

Kohrt, Holbrook E.; Nouri, Navid; Nowels, Kent; Johnson, Denise; Holmes, Susan; Lee, Peter P. (2005): Profile of immune cells in axillary lymph nodes predicts disease-free survival in breast cancer. In: *PLoS Med.* 2 (9), S. e284.

Koller, C. A.; King, G. W.; Hurtubise, P. E.; Sagone, A. L.; LoBuglio, A. F. (1973): Characterization of glass adherent human mononuclear cells. In: *J. Immunol.* 111 (5), S. 1610–1612.

Kolumam, Ganesh A.; Thomas, Sunil; Thompson, Lucas J.; Sprent, Jonathan; Murali-Krishna, Kaja (2005): Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. In: *J. Exp. Med.* 202 (5), S. 637–650.

Korthals, Mark; Safaian, Nancy; Kronenwett, Ralf; Maihöfer, Dagmar; Schott, Matthias; Papewalis, Claudia et al. (2007): Monocyte derived dendritic cells generated by IFN-alpha acquire mature dendritic and natural killer cell properties as shown by gene expression analysis. In: *Journal of translational medicine* 5, S. 46.

Kriegler, M.; Perez, C.; DeFay, K.; Albert, I.; Lu, S. D. (1988): A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. In: *Cell* 53 (1), S. 45–53.

Krutzik, Stephan R.; Tan, Belinda; Li, Huiying; Ochoa, Maria Teresa; Liu, Philip T.; Sharfstein, Sarah E. et al. (2005): TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. In: *Nat. Med.* **11** (6), S. 653–660.

Lähdevirta, J.; Maury, C. P.; Teppo, A. M.; Repo, H. (1988): Elevated levels of circulating cachectin/tumor necrosis factor in patients with acquired immunodeficiency syndrome. In: *Am. J. Med.* 85 (3), S. 289–291.

Larsen, C. P.; Ritchie, S. C.; Hendrix, R.; Linsley, P. S.; Hathcock, K. S.; Hodes, R. J. et al. (1994): Regulation of immunostimulatory function and costimulatory molecule (B7-1 and B7-2) expression on murine dendritic cells. In: *J. Immunol.* 152 (11), S. 5208–5219.

Larsen, C. P.; Ritchie, S. C.; Pearson, T. C.; Linsley, P. S.; Lowry, R. P. (1992): Functional expression of the costimulatory molecule, B7/BB1, on murine dendritic cell populations. In: *J. Exp. Med.* 176 (4), S. 1215–1220.

Lechmann, Matthias; Berchtold, Susanne; Hauber, Joachim; Steinkasserer, Alexander (2002): CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. In: *Trends Immunol.* 23 (6), S. 273–275.

Liu, Yong-Jun (2005): IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. In: *Annu. Rev. Immunol.* 23, S. 275–306.

Lu, P. H.; Negrin, R. S. (1994): A novel population of expanded human CD3+CD56+ cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency. In: *J. Immunol* 153 (4), S. 1687–1696.

Luft, T.; Pang, K. C.; Thomas, E.; Hertzog, P.; Hart, D. N.; Trapani, J.; Cebon, J. (1998): Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells. In: *J. Immunol.* 161 (4), S. 1947–1953.

Lutz, M. P.; Gaedicke, G.; Hartmann, W. (1992): Large-scale cell separation by centrifugal elutriation. In: *Anal. Biochem.* 200 (2), S. 376–380.

Mailliard, Robbie B.; Wankowicz-Kalinska, Anna; Cai, Quan; Wesa, Amy; Hilkens, Catharien M.; Kapsenberg, Martien L. et al. (2004): alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. In: *Cancer Res.* 64 (17), S. 5934–5937.

Marrack, P.; Kappler, J.; Mitchell, T. (1999): Type I interferons keep activated T cells alive. In: *J. Exp. Med.* 189 (3), S. 521–530.

Mellman, I.; Steinman, R. M. (2001): Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. In: *Cell* 106 (3), S. 255–258.

Michie, H. R.; Manogue, K. R.; Spriggs, D. R.; Revhaug, A.; O'Dwyer, S.; Dinarello, C. A. et al. (1988): Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. In: *N. Engl. J. Med* 318 (23), S. 1481–1486.

Miller, V. E.; Rogers, K.; Muirden, K. D. (1993): Detection of tumour necrosis factor alpha and interleukin-1 beta in the rheumatoid osteoarthritic cartilage-pannus junction by immunohistochemical methods. In: *Rheumatol. Int.* 13 (2), S. 77–82.

Miltenyi, S.; Müller, W.; Weichel, W.; Radbruch, A. (1990): High gradient magnetic cell separation with MACS. In: *Cytometry* 11 (2), S. 231–238.

Ming, W. J.; Bersani, L.; Mantovani, A. (1987): Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. In: *J. Immunol.* 138 (5), S. 1469–1474.

Mohamadzadeh, M.; Berard, F.; Essert, G.; Chalouni, C.; Pulendran, B.; Davoust, J. et al. (2001): Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells. In: *J. Exp. Med.* 194 (7), S. 1013–1020.

Mohty, Mohamad; Vialle-Castellano, Alexandra; Nunes, Jacques A.; Isnardon, Daniel; Olive, Daniel; Gaugler, Béatrice (2003): IFN-alpha skews monocyte differentiation into Toll-like receptor 7-expressing dendritic cells with potent functional activities. In: *J. Immunol.* 171 (7), S. 3385–3393.

Molday, R. S.; Yen, S. P.; Rembaum, A. (1977): Application of magnetic microspheres in labelling and separation of cells. In: *Nature* 268 (5619), S. 437–438.

Morelli, A. E.; Zahorchak, A. F.; Larregina, A. T.; Colvin, B. L.; Logar, A. J.; Takayama, T. et al. (2001): Cytokine production by mouse myeloid dendritic cells in relation to differentiation and terminal maturation induced by lipopolysaccharide or CD40 ligation. In: *Blood* 98 (5), S. 1512–1523.

Moser, M.; Murphy, K. M. (2000): Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. In: *Nat. Immunol.* 1 (3), S. 199–205.

Mukherji, B.; Chakraborty, N. G.; Yamasaki, S.; Okino, T.; Yamase, H.; Sporn, J. R. et al. (1995): Induction of antigen-specific cytolytic T cells in situ in human melanoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologous antigen presenting cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (17), S. 8078–8082.

Munker, R.; Gasson, J.; Ogawa, M.; Koeffler, H. P.: Recombinant human TNF induces production of granulocyte-monocyte colony-stimulating factor. In: *Nature* 323 (6083), S. 79–82.

Nestle, Frank O.; Farkas, Arpad; Conrad, Curdin (2005): Dendritic-cell-based therapeutic vaccination against cancer. In: *Curr. Opin. Immunol.* 17 (2), S. 163–169.

Nicklin, Martin J. H.; Barton, Jenny L.; Nguyen, Minh; FitzGerald, Michael G.; Duff, Gordon W.; Kornman, Ken (2002): A sequence-based map of the nine genes of the human interleukin-1 cluster. In: *Genomics* 79 (5), S. 718–725.

Nowrousian, M. R.; Waschke, S.; Bojko, P.; Welt, A.; Schuett, P.; Ebeling, P. et al. (2003): Impact of chemotherapy regimen and hematopoietic growth factor on mobilization and collection of peripheral blood stem cells in cancer patients. In: *Ann. Oncol.* 14 Suppl 1, S. i29-36.

Oppenheim, J. J. (2001): Cytokines: past, present, and future. In: Int. J. Hematol 74 (1), S. 3-8.

Ou, Dawei; Metzger, Daniel L.; Wang, Xiaojie; Pozzilli, Paolo; Tingle, Aubrey J. (2002): beta-cell antigen-specific CD56(+) NKT cells from type 1 diabetic patients: autoaggressive effector T cells damage human CD56(+) beta cells by HLA-restricted and non-HLA-restricted pathways. In: *Hum. Immunol* 63 (4), S. 256–270.

Papewalis, C.; Wuttke, M.; Jacobs, B.; Domberg, J.; Willenberg, H.; Baehring, T. et al. (2008a): Dendritic cell vaccination induces tumor epitope-specific Th1 immune response in medullary thyroid carcinoma. In: *Horm. Metab. Res.* 40 (2), S. 108–116.

Papewalis, Claudia; Fassnacht, Martin; Willenberg, Holger S.; Domberg, Julia; Fenk, Roland; Rohr, Ulrich-Peter et al. (2006): Dendritic cells as potential adjuvant for immunotherapy in adrenocortical carcinoma. In: *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 65 (2), S. 215–222.

Papewalis, Claudia; Jacobs, Benedikt; Wuttke, Margret; Ullrich, Evelyn; Baehring, Thomas; Fenk, Roland et al. (2008b): IFN-alpha skews monocytes into CD56+-expressing dendritic cells with potent functional activities in vitro and in vivo. In: *J. Immunol.* 180 (3), S. 1462–1470.

Paquette, R. L.; Hsu, N. C.; Kiertscher, S. M.; Park, A. N.; Tran, L.; Roth, M. D.; Glaspy, J. A. (1998): Interferon-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells. In: *J. Leukoc. Biol.* 64 (3), S. 358–367.

Parlato, S.; Santini, S. M.; Lapenta, C.; Di Pucchio, T.; Logozzi, M.; Spada, M. et al. (2001): Expression of CCR-7, MIP-3beta, and Th-1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells: importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities. In: *Blood* 98 (10), S. 3022–3029.

Pertoft, H.; Johnsson, A.; Wärmegård, B.; Seljelid, R. (1980): Separation of human monocytes on density gradients of Percoll. In: *J. Immunol. Methods* 33 (3), S. 221–229.

Pfeffer, K.; Matsuyama, T.; Kündig, T. M.; Wakeham, A.; Kishihara, K.; Shahinian, A. et al. (1993): Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection. In: *Cell* 73 (3), S. 457–467.

Pfeffer, L. M.; Dinarello, C. A.; Herberman, R. B.; Williams, B. R.; Borden, E. C.; Bordens, R. et al. (1998): Biological properties of recombinant alpha-interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons. In: *Cancer Res.* 58 (12), S. 2489–2499.

Piersma, Sytse J.; Jordanova, Ekaterina S.; van Poelgeest, Mariëtte I. E.; Kwappenberg, Kitty M. C.; van der Hulst, Jeanette M.; Drijfhout, Jan W. et al. (2007): High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. In: *Cancer Res.* 67 (1), S. 354–361.

Reid, C. D.; Stackpoole, A.; Meager, A.; Tikerpae, J. (1992): Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34+ progenitors in human bone marrow. In: *J. Immunol.* 149 (8), S. 2681–2688.

Roach, Daniel R.; Bean, Andrew G. D.; Demangel, Caroline; France, Malcolm P.; Briscoe, Helen; Britton, Warwick J. (2002): TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. In: *J. Immunol.* 168 (9), S. 4620–4627.

Robertson, M. J.; Ritz, J. (1990): Biology and clinical relevance of human natural killer cells. In: *Blood* 76 (12), S. 2421–2438.

Rohatiner, A. Z. S.; Gregory, W. M.; Peterson, B.; Borden, E.; Solal-Celigny, P.; Hagenbeek, A. et al. (2005): Meta-analysis to evaluate the role of interferon in follicular lymphoma. In: *J. Clin. Oncol.* 23 (10), S. 2215–2223.

Roithmaier, Sabine; Haydon, Andrew M.; Loi, Sherene; Esmore, Don; Griffiths, Ann; Bergin, Peter et al. (2007): Incidence of malignancies in heart and/or lung transplant recipients: a single-institution experience. In: *J. Heart Lung Transplant*. 26 (8), S. 845–849.

Romani, N.; Schuler, G.: Structural and functional relationships between epidermal Langerhans cells and dendritic cells. In: *Res. Immunol.* 140 (9), S. 895-8; discussion 918-26.

Romani, N.; Gruner, S.; Brang, D.; Kämpgen, E.; Lenz, A.; Trockenbacher, B. et al. (1994): Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. In: *J. Exp. Med.* 180 (1), S. 83–93.

Royer, P-J; Tanguy-Royer, S.; Ebstein, F.; Sapede, C.; Simon, T.; Barbieux, I. et al. (2006): Culture medium and protein supplementation in the generation and maturation of dendritic cells. In: *Scand. J. Immunol.* 63 (6), S. 401–409.

Ruitenberg, Joyce J.; Mulder, Candice B.; Maino, Vernon C.; Landay, Alan L.; Ghanekar, Smita A. (2006): VACUTAINER CPT and FicoII density gradient separation perform equivalently in maintaining the quality and function of PBMC from HIV seropositive blood samples. In: *BMC Immunol* 7, S. 11.

Sallusto, F.; Lanzavecchia, A. (1994): Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. In: *J. Exp. Med.* 179 (4), S. 1109–1118.

Sallusto, F.; Cella, M.; Danieli, C.; Lanzavecchia, A. (1995): 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. In: *J. Exp. Med.* 182 (2), S. 389–400.

Santini, S. M.; Lapenta, C.; Logozzi, M.; Parlato, S.; Spada, M.; Di Pucchio, T.; Belardelli, F. (2000): Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. In: *J. Exp. Med.* 191 (10), S. 1777–1788.

Scheurich, P.; Thoma, B.; Ucer, U.; Pfizenmaier, K. (1987): Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor (TNF)-alpha: induction of TNF receptors on human T cells and TNF-alpha-mediated enhancement of T cell responses. In: *J. Immunol.* 138 (6), S. 1786–1790.

Schott, M.; Scherbaum, W. A. (2004): Immunotherapy and gene therapy of thyroid cancer. In: *Minerva Endocrinol.* 29 (4), S. 175–187.

Schott, M.; Feldkamp, J.; Lettmann, M.; Simon, D.; Scherbaum, W. A.; Seissler, J. (2001a): Dendritic cell immunotherapy in a neuroendocrine pancreas carcinoma. In: *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 55 (2), S. 271–277.

Schott, M.; Feldkamp, J.; Schattenberg, D.; Krueger, T.; Dotzenrath, C.; Seissler, J.; Scherbaum, W. A. (2000): Induction of cellular immunity in a parathyroid carcinoma treated with tumor lysate-pulsed dendritic cells. In: *Eur. J. Endocrinol.* 142 (3), S. 300–306.

Schott, M.; Feldkamp, J.; Schattenberg, D.; Seissler, J.; Scherbaum, W. A. (1999): Dendritic cell immuno-therapy in disseminated parathyroid carcinoma. In: *Lancet* 353 (9159), S. 1188–1189.

Schott, M.; Seissler, J.; Lettmann, M.; Fouxon, V.; Scherbaum, W. A.; Feldkamp, J. (2001b): Immunotherapy for medullary thyroid carcinoma by dendritic cell vaccination. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (10), S. 4965–4969.

Schott, Matthias (2006): Immunesurveillance by dendritic cells: potential implication for immunotherapy of endocrine cancers. In: *Endocr. Relat. Cancer* 13 (3), S. 779–795.

Schott, Matthias; Seissler, Jochen: Dendritic cell vaccination: new hope for the treatment of metastasized endocrine malignancies. In: *Trends Endocrinol. Metab.* 14 (4), S. 156–162.

Schott, Matthias; Feldkamp, Joachim; Klucken, Melanie; Kobbe, Guido; Scherbaum, Werner A.; Seissler, Jochen (2002): Calcitonin-specific antitumor immunity in medullary thyroid carcinoma following dendritic cell vaccination. In: *Cancer Immunol. Immunother* 51 (11-12), S. 663–668.

Schreiber, S.; Kilgus, O.; Payer, E.; Kutil, R.; Elbe, A.; Mueller, C.; Stingl, G. (1992): Cytokine pattern of Langerhans cells isolated from murine epidermal cell cultures. In: *J. Immunol* 149 (11), S. 3524–3534.

Schuler, G.; Romani, N. (1997): Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. In: *Adv. Exp. Med. Biol.* 417, S. 7–13.

Schuler, G.; Steinman, R. M. (1997): Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors. In: J. Exp. Med. 186 (8), S. 1183–1187.

Schuler, Gerold; Schuler-Thurner, Beatrice; Steinman, Ralph M. (2003): The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. In: *Curr. Opin. Immunol.* 15 (2), S. 138–147.

Schuler-Thurner, Beatrice; Schultz, Erwin S.; Berger, Thomas G.; Weinlich, Georg; Ebner, Susanne; Woerl, Petra et al. (2002): Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells. In: *J. Exp. Med.* 195 (10), S. 1279–1288.

Scuderi, P.; Sterling, K. E.; Lam, K. S.; Finley, P. R.; Ryan, K. J.; Ray, C. G. et al. (1986): Raised serum levels of tumour necrosis factor in parasitic infections. In: *Lancet* 2 (8520), S. 1364–1365.

Shalaby, M. R.; Aggarwal, B. B.; Rinderknecht, E.; Svedersky, L. P.; Finkle, B. S.; Palladino, M. A. (1985): Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon-gamma and tumor necrosis factors. In: *J. Immunol.* 135 (3), S. 2069–2073.

Sharma, Padmanee; Shen, Yu; Wen, Sijin; Yamada, Sachiko; Jungbluth, Achim A.; Gnjatic, Sacha et al. (2007): CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (10), S. 3967–3972.

Siegal, F. P.; Kadowaki, N.; Shodell, M.; Fitzgerald-Bocarsly, P. A.; Shah, K.; Ho, S. et al. (1999): The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. In: *Science* 284 (5421), S. 1835–1837.

Siena, S.; Di Nicola, M.; Bregni, M.; Mortarini, R.; Anichini, A.; Lombardi, L. et al. (1995): Massive ex vivo generation of functional dendritic cells from mobilized CD34+ blood progenitors for anticancer therapy. In: *Exp. Hematol.* 23 (14), S. 1463–1471.

Smith, C. A.; Farrah, T.; Goodwin, R. G. (1994): The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. In: *Cell* 76 (6), S. 959–962.

Stanciu, L. A.; Shute, J.; Holgate, S. T.; Djukanović, R. (1996): Production of IL-8 and IL-4 by positively and negatively selected CD4+ and CD8+ human T cells following a four-step cell separation method including magnetic cell sorting (MACS). In: *J. Immunol. Methods* 189 (1), S. 107–115.

Steinman, R. M. (1991): The dendritic cell system and its role in immunogenicity. In: *Annu. Rev. Immunol.* 9, S. 271–296.

Steinman, R. M.; Dhodapkar, M. (2001): Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future. In: *Int. J. Cancer* 94 (4), S. 459–473.

Stovroff, M. C.; Fraker, D. L.; Travis, W. D.; Norton, J. A. (1989): Altered macrophage activity and tumor necrosis factor: tumor necrosis and host cachexia. In: *J. Surg. Res.* 46 (5), S. 462–469.

Stuart, Lynda M.; Lucas, Mark; Simpson, Cathy; Lamb, Jonathan; Savill, John; Lacy-Hulbert, Adam (2002): Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic cell maturation. In: *J. Immunol.* 168 (4), S. 1627–1635.

Sun, S.; Zhang, X.; Tough, D. F.; Sprent, J. (1998): Type I interferon-mediated stimulation of T cells by CpG DNA. In: *J. Exp. Med.* 188 (12), S. 2335–2342.

Taieb, Julien; Chaput, Nathalie; Ménard, Cédric; Apetoh, Lionel; Ullrich, Evelyn; Bonmort, Mathieu et al. (2006): A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. In: *Nat. Med.* 12 (2), S. 214–219.

Tang, P.; Hung M-C; Klostergaard, J. (1996): Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. In: *Biochemistry* 35 (25), S. 8216–8225.

Tartaglia, L. A.; Goeddel, D. V. (1992): Two TNF receptors. In: Immunol. Today 13 (5), S. 151–153.

Tartaglia, L. A.; Ayres, T. M.; Wong, G. H.; Goeddel, D. V. (1993): A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. In: *Cell* 74 (5), S. 845–853.

Théry, C.; Amigorena, S. (2001): The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. In: *Curr. Opin. Immunol.* 13 (1), S. 45–51.

Thiel, A.; Scheffold, A.; Radbruch, A. (1998): Immunomagnetic cell sorting--pushing the limits. In: *Immunotechnology* 4 (2), S. 89–96.

Tosi, Diego; Valenti, Roberta; Cova, Agata; Sovena, Gloria; Huber, Veronica; Pilla, Lorenzo et al. (2004): Role of cross-talk between IFN-alpha-induced monocyte-derived dendritic cells and NK cells in priming CD8+ T cell responses against human tumor antigens. In: *J. Immunol.* 172 (9), S. 5363–5370.

Tracey, K. J.; Cerami, A. (1994): Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. In: *Annu. Rev. Med.* 45, S. 491–503.

Tracey, K. J.; Lowry, S. F.; Fahey, T. J.; Albert, J. D.; Fong, Y.; Hesse, D. et al. (1987): Cachectin/tumor necrosis factor induces lethal shock and stress hormone responses in the dog. In: *Surg Gynecol Obstet* 164 (5), S. 415–422.

Treves, A. J.; Yagoda, D.; Haimovitz, A.; Ramu, N.; Rachmilewitz, D.; Fuks, Z. (1980): The isolation and purification of human peripheral blood monocytes in cell suspension. In: *J. Immunol. Methods* 39 (1-2), S. 71–80.

Trinchieri, G.; Santoli, D.; Dee, R. R.; Knowles, B. B. (1978): Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Identification of the anti-viral activity as interferon and characterization of the human effector lymphocyte subpopulation. In: *J. Exp. Med* 147 (5), S. 1299–1313.

Turley, S. J.; Inaba, K.; Garrett, W. S.; Ebersold, M.; Unternaehrer, J.; Steinman, R. M.; Mellman, I. (2000): Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. In: *Science* 288 (5465), S. 522–527.

van Horssen, Remco; Hagen, Timo L. M. ten; Eggermont, Alexander M. M. (2006): TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. In: *Oncologist* 11 (4), S. 397–408.

Vandenabeele, P.; Declercq, W.; Beyaert, R.; Fiers, W. (1995): Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. In: *Trends Cell Biol.* 5 (10), S. 392–399.

Waage, A.; Halstensen, A.; Espevik, T. (1987): Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. In: *Lancet* 1 (8529), S. 355–357.

Wahlin, Björn Engelbrekt; Sander, Birgitta; Christensson, Birger; Kimby, Eva (2007): CD8+ T-cell content in diagnostic lymph nodes measured by flow cytometry is a predictor of survival in follicular lymphoma. In: *Clin. Cancer Res.* 13 (2 Pt 1), S. 388–397.

Wajant, H.; Pfizenmaier, K.; Scheurich, P. (2003): Tumor necrosis factor signaling. In: *Cell Death Differ*. 10 (1), S. 45–65.

Wilkinson, L. S.; Edwards, J. C. (1991): Binding of antibodies raised against tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) to blood vessels and macrophages in inflamed synovial tissue. In: *Rheumatol. Int.* 11 (1), S. 19–25.

Witmer-Pack, M. D.; Olivier, W.; Valinsky, J.; Schuler, G.; Steinman, R. M. (1987): Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is essential for the viability and function of cultured murine epidermal Langerhans cells. In: *J. Exp. Med.* 166 (5), S. 1484–1498.

Wright, S. D.; Ramos, R. A.; Tobias, P. S.; Ulevitch, R. J.; Mathison, J. C. (1990): CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. In: *Science* 249 (4975), S. 1431–1433.

Young, J. W.; Steinman, R. M. (1990): Dendritic cells stimulate primary human cytolytic lymphocyte responses in the absence of CD4+ helper T cells. In: *J. Exp. Med.* 171 (4), S. 1315–1332.

Zhou, L. J.; Tedder, T. F. (1995): Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. In: *J. Immunol.* 154 (8), S. 3821–3835.

6. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich bei dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Ich möchte mich zuerst ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn **Univ.-Prof. Dr. Matthias Schott** für die Ermöglichung und Betreuung meiner Arbeit bedanken. Vielen Dank, dass du mir einen intensiven Einblick in die Forschung ermöglichst hast und mich und meine Arbeit immer unterstützt hast. Deine Tür stand jeder Zeit für mich offen und du hattest ein Ohr für meine Fragen. Dafür nochmal einen ganz herzlichen Dank!

Dann möchte ich mich bei Herrn **Univ.-Prof. Dr. W. Scherbaum** für die Möglichkeit zur Erstellung dieser Arbeit und der Nutzung der Labore der Klinik für Endokrinologie bedanken. Herrn **Univ.-Prof. Dr. M. Roden** danke ich für die nahtlose Fortführung dieser Möglichkeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau **Dr.rer.nat. Claudia Papewalis** und Frau **Dr.rer.nat. Magret Ehlers** für die gute, ausdauernde Unterstützung bei der Laborarbeit und der Erstellung der Dissertation, die fachliche Betreuung, dem Beantworten unzähliger Fragen, für kritische Kommentare, Fußballdiskussionen und nette Worte zum Durchhalten. Das war super!

Ganz herzlich danken möchte ich auch Herrn **Dr.med. Benedikt Jacobs** für seine tolle Unterstützung. Danke für die gute Einarbeitung, die Unterstützung bei der Laborarbeit, und dass du dir immer wieder viel Zeit für meine Fragen genommen hast.

Ein weiteres herzliches Dankeschön gilt allen Mitarbeitern der Labore der Endokrinologie der Uniklinik Düsseldorf, allen voran Frau **Roswitha Charko**.

Danke für die vielen kleinen und großen Hilfen für den "blutigen Anfänger", sowie die wertvollen "Alltags-Tipps" bei der Laborarbeit und natürlich die netten Gespräche zwischendurch.

Ich danke **meinen Eltern und meiner Schwester** von ganzem Herzen. Sie haben die Höhen und Tiefen bei der Erstellung dieser Arbeit häufig miterlebt und mir immer wieder zu neuer Kraft verholfen. Ebenso danken möchte ich Frau **Dr.med. Eva Schmidt** und Herrn **Dr.med. Mathias Göppert** für deren ständige Unterstützung und die kurzweiligen, ablenkenden und entspannenden "postlabor" Abende. Herzlichen Dank für eure tolle Unterstützung!
7. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

26.05.2013, Christian Stüßgen

Unterschrift