

**Mit IFN- α hergestellte dendritische Zellen zeigen Eigenschaften
von reifen plasmazytoiden dendritischen Zellen
und von NK-Zellen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Mark Korthals
aus Köln

Februar 2007

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie
des Universitätsklinikums Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. R. Haas)

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: PD Dr. R. Kronenwett
Koreferent: Prof. Dr. J.F. Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2001

„Omnis cellula e cellula“
(R. Virchow)

Für meine Mutter

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	7
1.1	Das Immunsystem.....	8
1.1.1	Die hämatopoetische Stammzelle.....	9
1.1.2	Zellen der myeloiden Linie.....	10
1.1.3	Zellen der lymphoiden Linie	10
1.1.3.1	B-Lymphozyten.....	10
1.1.3.2	T-Lymphozyten.....	12
1.1.3.3	NK-Zellen.....	13
1.1.4	Dendritische Zellen.....	14
1.1.4.1	Differenzierung der dendritischen Zellen.....	14
1.1.4.2	Phänotyp und Funktionen unreifer dendritischer Zellen	16
1.1.4.3	Reifung der dendritischen Zellen	17
1.1.4.4	Aktivierung naiver Antigen-spezifischer T-Zellen durch dendritische Zellen	18
1.1.4.5	Wechselwirkung der dendritischen Zellen mit NK-Zellen.....	19
1.2	Vakzinierungsstudien mit DCs bei malignen Erkrankungen	20
1.2.1	Konventionelle Protokolle zur Herstellung von dendritischen Zellen für Vakzinierungsansätze....	21
1.2.2	Generierung von dendritischen Zellen mit IFN- α	23
1.3	Das Multiple Myelom	25
1.4	Fragestellungen	27
2	MATERIAL UND METHODEN	28
2.1	Probanden und Zellmaterial.....	28
2.2	Materialien	28
2.2.1	Geräte und Software	28
2.2.2	Verbrauchsmaterialien.....	29
2.2.3	Chemikalien und Enzyme.....	30
2.2.4	<i>Kits</i>	32
2.2.5	Monoklonale Antikörper	32
2.2.6	Synthetische Oligonukleotide.....	34
2.2.7	Verwendete Puffer und Lösungen	34
2.3	Methoden.....	36
2.3.1	Herstellung und Analyse von Zellpräparationen	36
2.3.1.1	Gewinnung mononukleärer Zellen	36
2.3.1.2	Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung	36
2.3.1.3	Anreicherung von Monozyten durch Negativselektion	37
2.3.1.4	Anreicherung von Monozyten durch das Adhärenz-Verfahren.....	37
2.3.1.5	Kultivierung von dendritischen Zellen	38
2.3.1.6	Kryokonservierung und Auftauen von Zellpräparationen	38
2.3.1.7	Färbung von Zellpräparaten und Mikroskopie	38
2.3.1.8	Durchflusszytometrie	39

2.3.1.9	Allogene gemischte Leukozyten-Reaktion (MLR).....	40
2.3.1.10	Intrazelluläre durchflusszytometrische Zytokindetektion.....	42
2.3.1.11	Migrationsassay.....	43
2.3.1.12	Zytotoxizitätsassay	43
2.3.1.13	Genexpressionsanalyse.....	44
2.3.1.13.1	Theoretischer Hintergrund	44
2.3.1.13.2	RNA-Extraktion aus Zellpräparationen.....	45
2.3.1.13.3	cDNA-Synthese	46
2.3.1.13.4	Aufreinigung der doppelsträngigen cDNA	47
2.3.1.13.5	Synthese und Markierung der cRNA	47
2.3.1.13.6	Aufreinigung und Fragmentierung der cRNA.....	48
2.3.1.13.7	Qualitätskontrolle der Gesamt-RNA und der cRNA.....	49
2.3.1.13.8	Hybridisierung der cRNA und Scannen der <i>Microarrays</i>	49
2.3.1.13.9	Ermittlung der differenziell exprimierten Gene	50
2.3.1.14	Quantitative Real-Time-PCR zur Verifizierung der <i>Microarray</i> -Daten.....	51
2.3.1.14.1	cDNA-Synthese	51
2.3.1.14.2	Real-Time-PCR.....	51
2.3.2	Vakzinierung von Patienten mit Multiplem Myelom mit CDR3-Peptid-beladenen dendritischen Zellen.....	53
2.3.2.1	Molekularbiologische Methoden zur Identifizierung der CDR3-Sequenz	53
2.3.2.1.1	Gewinnung der cDNA	53
2.3.2.1.2	Klonierung der cDNA-Fragmente in <i>E.coli</i> -Bakterien.....	53
2.3.2.1.3	Ermittlung der CDR3-Sequenz und Herstellung des CDR3-Peptids.....	54
2.3.2.2	Herstellung, Beladung und Verabreichung der dendritischen Zellen.....	55
2.3.2.3	Serologisches und molekulares Monitoring der vakzinierten Patienten.....	56
2.3.2.3.1	Serologische Parameter	56
2.3.2.3.2	Detektion der minimalen Resterkrankung im peripheren Blut mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR	56
2.3.2.3.2.1	Synthese von Patienten-spezifischen Primern und Sonden für die individuelle CDR3-Sequenz	57
2.3.2.3.2.2	Etablierung einer Patienten-spezifischen, quantitativen Real-Time-PCR zur Quantifizierung der CDR3-Sequenz.....	57
2.3.2.3.2.3	Quantifizierung der CDR3-Sequenz in mononukleären Zellpräparationen.....	58
2.3.3	Statistische Auswertungen.....	59
3	ERGEBNISSE	60
3.1	Analyse von IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs	60
3.1.1	Ausbeute, Viabilität und Reinheit.....	60
3.1.2	Morphologie	62
3.1.3	Immunphänotypische Charakterisierung	62
3.1.4	Unterschiede in der Genexpression	66
3.1.4.1	Signalwege von IFN- α , IL-4 und TNF- α	66

3.1.4.2	Allgemeiner Stoffwechsel und Zellzyklus.....	68
3.1.4.3	Antigenaufnahme, -prozessierung und -präsentation.....	68
3.1.4.4	Migration und Adhäsion.....	69
3.1.4.5	Überlebenssignale und Aktivierungsstatus.....	70
3.1.4.6	Proinflammatorisches Potenzial.....	70
3.1.4.7	Zytotoxizität.....	71
3.1.4.8	Myeloide und plasmazytoide DC-Marker.....	72
3.1.5	Bestätigung der <i>Microarray</i> -Daten.....	73
3.1.5.1	Quantitative Real-Time-PCR.....	73
3.1.5.2	Vergleich der <i>Microarray</i> -Daten mit dem Immunphänotyp.....	74
3.1.6	Funktionalität.....	75
3.1.6.1	Allogene gemischte Leukozyten-Reaktion.....	75
3.1.6.2	Intrazelluläre Zytokin-Detektion in T-Zellen.....	76
3.1.6.3	Migration.....	77
3.1.7	NK-Zell-Eigenschaften von IFN-DCs.....	78
3.2	Vakzinierung von Patienten mit dendritischen Zellen und Patienten-spezifischem CDR3-Peptid ..	81
3.2.1	Vergleich zweier Methoden zur Anreicherung von Monozyten: Adhärenz-Verfahren und Negativselektion.....	81
3.2.2	Vergleich von frischen und kryokonservierten dendritischen Zellen.....	83
3.2.3	Generierung von dendritischen Zellen, die mit CDR3-Peptid beladen wurden und Vakzinierung von Patienten mit Multiplem Myelom.....	84
3.2.4	Serologisches und molekulares Monitoring der vakzinierten Patienten.....	85
3.2.4.1	Patient 1.....	86
3.2.4.2	Patient 2.....	86
4	DISKUSSION.....	89
4.1	Mit GM-CSF und IFN- α können unter serumfreien Bedingungen dendritische Zellen aus Monozyten generiert werden.....	90
4.2	IFN-DCs haben einen fortgeschrittenen Reifungszustand.....	93
4.3	IFN-DCs zeigen Eigenschaften von plasmazytoiden dendritischen Zellen und NK-Zellen.....	96
4.4	IFN-DCs sind eine vielversprechende Alternative für Zell-basierte Vakzinierungsstrategien....	100
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	103
6	ANHANG.....	116
6.1	Abkürzungen.....	116
6.2	Wichtige Vakzinierungsstudien.....	119
6.3	Differenziell exprimierte Gene in IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs.....	122
6.4	Zusammenfassung.....	131
6.5	Summary.....	133
6.6	Danksagung.....	135

1 Einleitung

Dendritische Zellen (DCs) sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APCs) des Immunsystems [1]. Sie können eine Antigen-spezifische, primäre Immunantwort auslösen. Dazu nehmen sie als unreife DCs Antigene durch Phagozytose auf. Diese phagozytierten Antigene werden intrazellulär prozessiert und auf der Zelloberfläche präsentiert. Als reife DCs migrieren die DCs dann zu den nächstgelegenen Lymphknoten, wo sie Antigen-spezifische naive T- und B-Zellen aktivieren und eine zelluläre und humorale Immunantwort auslösen.

DCs wurden erstmals 1868 von dem deutschen Pathologen Paul Langerhans in der menschlichen Haut beschrieben [2]. Mikroskopisch ist das Erscheinungsbild der DCs durch lange zytoplasmatische Fortsätze charakterisiert. Daher hielt man sie lange Zeit für Nervenzellen. Erst seit der Entdeckung von DCs in den Lymphorganen von Mäusen im Jahr 1973 durch Ralf Steinman und Zanvil Cohn [3] wurde die Bedeutung dieser Zellen für die Funktion des Immunsystems erkannt. Heute weiß man, dass DCs in vielen Geweben vorkommen und eine heterogene Gruppe verschiedener Subpopulationen darstellen. Gegenstand der aktuellen Forschung ist es, die komplexen Mechanismen der Differenzierung der verschiedenen DC-Subpopulationen und die Regulation ihrer spezialisierten Funktionen zu verstehen [4].

Bei der Behandlung von Krankheiten wird versucht, die immunstimulierende Kapazität der DCs zu nutzen. DC-basierte Impfstoffe können eine Immunantwort gegen eine Vielzahl von bakteriellen und viralen Antigenen und von Tumorantigenen auslösen. Hierzu werden DCs mit Hilfe verschiedener proinflammatorischer Zytokine *ex vivo* aus Vorläuferzellen wie Monozyten oder Knochenmarkstammzellen in großem Maßstab generiert. Ein erfolgreiches klinisches Ansprechen nach einer Zelltherapie mit DCs konnte jedoch nur bei wenigen Patienten beobachtet werden. Daher besteht die Notwendigkeit zur Verbesserung der Protokolle zur *in vitro* Generierung von DCs.

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung von DCs, die mit Hilfe von Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) und Interferon (IFN) - α generiert wurden (IFN-DCs), im Vergleich zu herkömmlich in Anwesenheit von GM-CSF, Interleukin (IL) -4 und Tumor-Nekrosefaktor (TNF) - α hergestellten DCs (IL-4 / TNF-DCs).

Im Folgenden soll zunächst ein Überblick über die Differenzierung und Funktion der Immunzellen gegeben werden. Im Anschluss werden Differenzierung und Funktionen der DCs und ihre zentrale Rolle im Immunsystem dargestellt und eine Übersicht über die bislang erfolgten klinischen Vakzinierungsstudien mit DCs gezeigt. Schließlich wird das Multiple

Myelom (MM) als beispielhafte Krebserkrankung, für die eine Behandlung der Patienten mit IFN-DCs in Frage kommt, vorgestellt.

1.1 Das Immunsystem

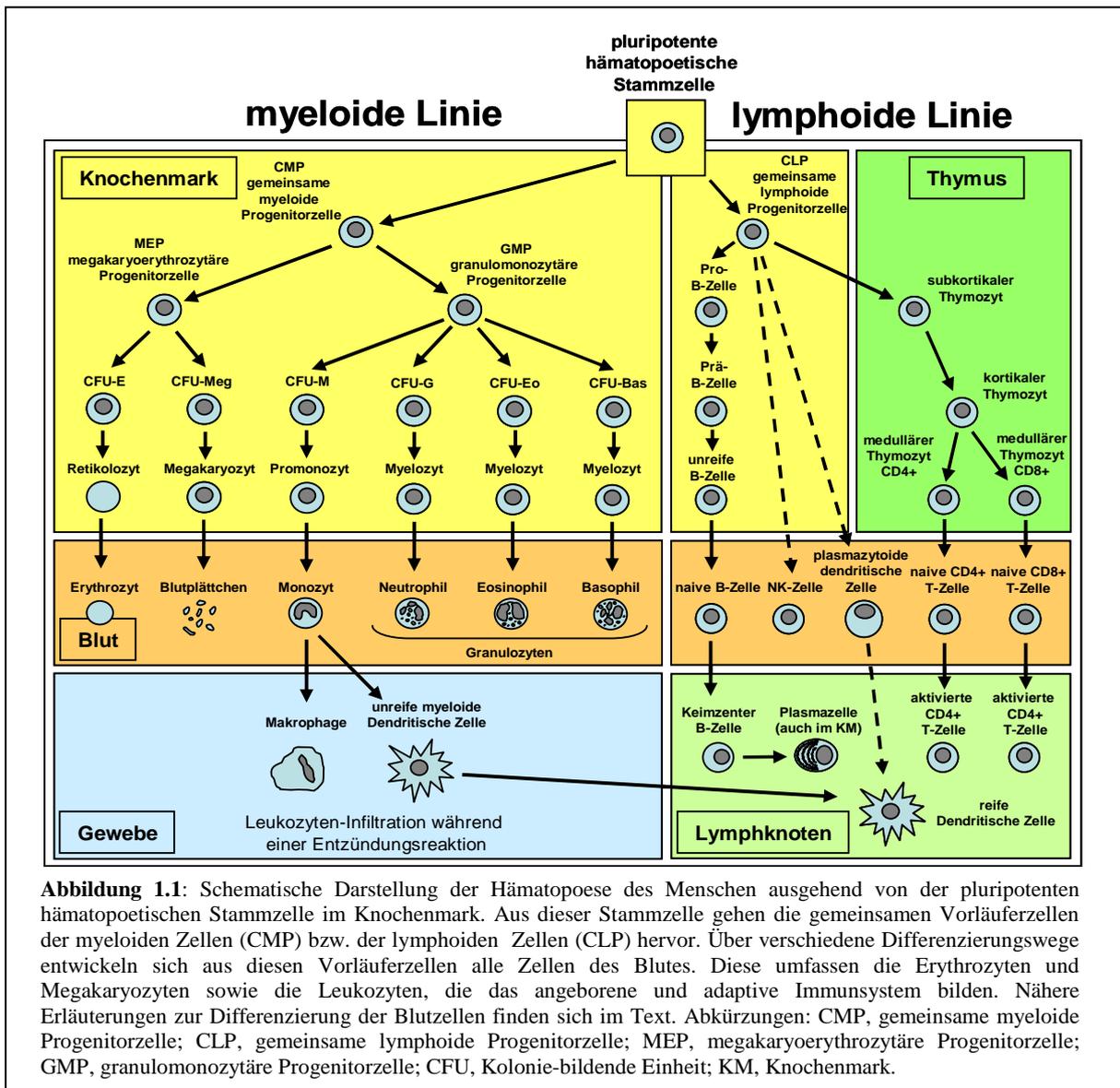
Das Immunsystem gliedert sich funktionell in zwei interagierende Teilsysteme, das angeborene und das adaptive Immunsystem. Alle Immunzellen gehen aus einer pluripotenten Stammzelle des Knochenmarks hervor. Die Zellen des angeborenen Immunsystems bilden die erste Verteidigungslinie in der Abwehr eindringender Pathogene, bevor die Antigen-spezifischen T- und B-Zellen des adaptiven Immunsystems aktiviert werden. Makrophagen, Monozyten, Granulozyten und natürliche Killer- (NK-) Zellen bilden das angeborene Immunsystem und erkennen Fremdzellen sowie eindringende Parasiten anhand typischer Oberflächenstrukturen und des Fehlens bestimmter körpereigener Moleküle, den sogenannten Haupthistokompatibilitäts (MHC) -Antigenen. Diese Immunzellen phagozytieren Fremdkörper und zerstören sie intrazellulär oder durch Ausschüttung zytotoxischer Moleküle.

Die Zellen des adaptiven Immunsystems, die B- und T-Lymphozyten, bilden Rezeptoren, die Antigene spezifisch binden können. B-Zellen differenzieren nach dem ersten Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen zu reifen Plasmazellen und lösen eine humorale Immunantwort aus, indem sie Antigen-spezifische Antikörper bilden und ins Blut sezernieren. T-Zellen unterteilen sich in zwei Subtypen. Die zytotoxischen T-Zellen können durch direkten Kontakt mit Zellen, die das spezifische Antigen präsentieren, deren Apoptose auslösen. Die Helfer-T-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der Aktivierung und Aufrechterhaltung sowohl der zellulären als auch der humoralen Immunabwehr. Die allgemeinen Prinzipien des Immunsystems sind sehr anschaulich in dem Lehrbuch „Immunologie“ [Janeway *et al.*, 5.Auflage] dargestellt.

Im Folgenden wird die Differenzierung der Immunzellen aus der hämatopoetischen Stammzelle beschrieben. Der Schwerpunkt wird dabei auf Monozyten als bekannte Vorläuferzellen der DCs und auf die Lymphozyten gelegt, deren Wechselwirkung mit DCs im Zentrum der Auslösung einer Immunantwort steht. Darüberhinaus wird detaillierter auf die Differenzierung der B-Zellen eingegangen, da sie die Ausgangszellen für die Pathogenese des Multiplen Myeloms sind.

1.1.1 Die hämatopoetische Stammzelle

Die Blutbildung (Hämatopoese) geht von der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle (HSC) im Knochenmark aus (**Abbildung 1.1**). Diese zeichnet sich durch die Expression von CD34, einem Marker für frühe hämatopoetische Vorläuferzellen, aus. Durch eine asymmetrische Zellteilung gehen aus dieser Stammzelle zwei verschiedene Tochterzellen hervor [5]. Die eine Tochterzelle verbleibt in einem pluripotenten, undifferenzierten Zustand. Hierdurch wird der Stammzellpool im Knochenmark aufrecht erhalten. Die zweite Tochterzelle differenziert zu einer Progenitorzelle mit eingeschränktem Differenzierungspotenzial. Diese kann sich im Knochenmark entweder über die gemeinsame lymphoide Progenitorzelle (CLP) zu B- und T-Lymphozyten sowie NK-Zellen entwickeln [6] oder über die gemeinsame myeloide Progenitorzelle (CMP) zu Erythrozyten und Thrombozyten bzw. Monozyten, Makrophagen und Granulozyten [7].



1.1.2 Zellen der myeloiden Linie

Aus der gemeinsamen myeloiden Progenitorzelle gehen die Vorläuferzellen (Koloniebildenden Einheiten, CFU) der einzelnen myeloiden Linien hervor. Noch im Knochenmark entstehen aus diesen Vorläuferzellen die unreifen Retikulozyten, Megakaryozyten, Promonozyten und -myelozyten. Nach ihrer vollständigen Differenzierung werden diese als reife Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten und Granulozyten (Neutrophile, Eosinophile und Basophile) in den Blutkreislauf freigesetzt.

Die Erythrozyten und Thrombozyten spielen eine wesentliche Rolle für den Sauerstofftransport bzw. die Blutgerinnung im menschlichen Körper.

Die Monozyten verlassen den Blutkreislauf, um in die peripheren Gewebe zu migrieren. Dort reifen sie zu Makrophagen heran, die als erste mit einem Pathogen in Kontakt kommen. Diese großen phagozytierenden Immunzellen erkennen zahlreiche Krankheitserreger mit Hilfe sogenannter Mustererkennungsrezeptoren, die antigene Strukturen wie z.B. die Lipopolysaccharide (LPS) von Bakterien binden können. Diese Erkennung induziert die Phagozytose des Pathogens. Der phagozytotische Vesikel, das Phagosom, fusioniert in der Zelle mit Lysosomen, die antimikrobielle Enzyme und Peptide, toxische Sauerstoffverbindungen und Proteasen beinhalten, das Pathogen abtöten und zerstören. Makrophagen eliminieren auf diese Weise auch abgestorbene Zellen. Durch die Ausschüttung von IFN- γ und TNF- α fördern sie zudem die zytotoxische Wirkung aktivierter T-Zellen.

Die Granulozyten, insbesondere die neutrophilen Granulozyten, werden im Zuge einer Entzündungsreaktion durch die Freisetzung von Chemokinen in das infizierte Gewebe gelockt. Sie unterstützen die Abwehrreaktion der Makrophagen durch eine Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität, indem sie Antikörper-opsonierte Krankheitserreger erkennen und durch Ausschüttung zytotoxischer Granula abtöten.

1.1.3 Zellen der lymphoiden Linie

Aus der gemeinsamen lymphoiden Progenitorzelle gehen die Lymphozyten hervor. Zu ihnen gehören sowohl die Zellen des adaptiven Immunsystems, die T- und B-Lymphozyten, als auch die NK-Zellen.

1.1.3.1 B-Lymphozyten

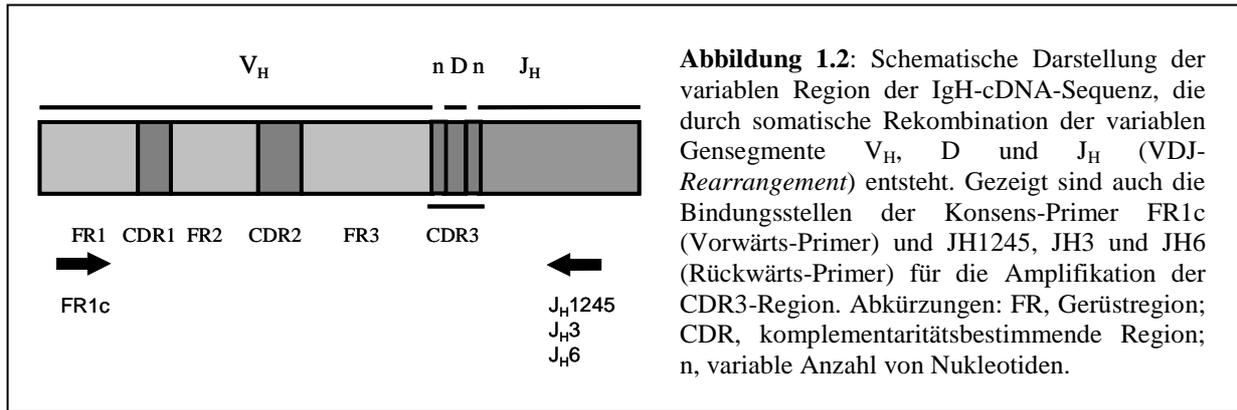
Die Differenzierung der B-Lymphozyten findet im Knochenmark statt. Dort differenziert die gemeinsame lymphoide Progenitorzelle über das Stadium einer Pro-B-Zelle und einer Prä-B-

Zelle zur unreifen B-Zelle. Im Verlauf der Differenzierung präsentiert die B-Zelle ihren spezifischen Antigen-Rezeptor (B-Zell-Rezeptor, BCR) auf der Zelloberfläche. Es handelt sich hierbei um einen individuellen Antikörper mit einer einzigartigen Antigen-Bindungsdomäne, der auch als Idiotyp bezeichnet wird und nur dieser B-Zelle eigen ist.

Antikörper bestehen aus je zwei identischen schweren und leichten Ketten, die jeweils eine variable (V-) und eine konstante (C-) Region besitzen. Die V-Regionen der schweren bzw. leichten Ketten werden von Gensegmenten, die als multiple Kopien mit variablen Nukleotidsequenzen in den entsprechenden Gen-Loci (IgH- bzw. IgL_κ- und IgL_λ-Lokus) liegen, kodiert. Das vollständige Exon für die variable Region der Ketten entsteht im Zuge des V(D)J-*Rearrangements*, einem somatischen DNA-Rekombinationsprozess in Pro- und Prä-B-Zellen. Hierbei werden je eins von 65 V_H-, 27 D_H- und 6 J_H-Gensegmenten für die schwere Kette sowie je eins von 40 V_κ- und 5 J_κ-Gensegmenten oder alternativ je eins von 30 V_λ- und 4 J_λ-Gensegmenten miteinander verknüpft. Nach der Transkription wird in den mRNAs für beide Ketten das Exon für die V-Region durch mRNA-Spleißen mit einem Exon für die C-Region verknüpft. Eine genauere Darstellung der Entstehung der Lymphozyten-Antigen-Rezeptoren ist in dem Lehrbuch „Immunologie“ [Janeway *et al.*, Kapitel 4, 5.Auflage] nachzulesen.

Der vollständige Antikörper wird auf unreifen B-Zellen als membranständiger Rezeptor exprimiert. Es überleben nur solche B-Lymphozyten, die einen funktionellen Antikörper produzieren. Durch negative Selektion werden zudem unreife Lymphozyten eliminiert, deren spezifischer Antikörper gegen körpereigene Peptidstrukturen gerichtet ist.

Die unreifen B-Zellen wandern in die nächstgelegenen Lymphknoten, wo sie durch die Bindung ihres Antikörper das spezifische Antigen erkennen, durch Phagozytose aufnehmen und auf ihrer Oberfläche präsentieren. Dort treten die B-Zellen mit aktivierten Helfer-T-Zellen in Wechselwirkung, die das präsentierte Antigen mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TCR) erkennen. Durch den Zellkontakt mit den Helfer-T-Zellen wird in der B-Zelle die somatische Hypermutation ausgelöst, wodurch Punktmutationen in den variablen Regionen der umgeordneten Gene der schweren und leichten Kette des Antikörpers eingeführt werden. Dies führt bei einigen B-Zellen zu einer weiteren Erhöhung der Antigen-Spezifität ihres Antikörpers. Nach diesen Hypermutationen unterscheiden sich die V-Regionen der schweren und leichten Ketten dieser Antikörper durch drei hypervariable Bereiche, die als komplementaritätsbestimmende Regionen (CDR1-3) bezeichnet werden (**Abbildung 1.2**). Die größte Variabilität findet sich bei beiden Ketten in der CDR3-Region, die im Bereich der Verknüpfungsstellen der V- und J-Segmente liegt.



Antigen-spezifische B-Zellen mit einem hochaffinen Antikörper werden selektiv zur Proliferation angeregt. Als Zentroblasten durchlaufen sie dann einen Prozess, der als Klassenwechsel bezeichnet wird. Die C-Region der schweren Kette wird dabei ebenfalls durch somatische Rekombination gegen ein alternatives C-Region-Exon ausgetauscht. Unterschiedliche C-Regionen definieren Antikörper unterschiedlicher Klassen. Als Zentrozyten synthetisieren die B-Zellen Antikörper der Klassen IgG, IgA und IgE, die Antikörper-abhängige Immunreaktionen unterschiedlicher Immuneffektorzellen induzieren. Als reife Plasmazellen wandern die B-Zellen schließlich zurück ins Knochenmark, wo sie große Mengen Antikörper ins Blut sezernieren. Diese binden dann an das spezifische Antigen und opsonieren im Blut zirkulierende Partikel wie z.B. Bakterien, die durch das Komplementsystem neutralisiert oder durch Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität eliminiert werden.

1.1.3.2 T-Lymphozyten

Die Differenzierung der T-Lymphozyten aus der gemeinsamen lymphoiden Progenitorzelle findet im Thymus statt. Der T-Zell-Rezeptor entsteht wie der B-Zell-Rezeptor durch somatische Rekombinationen während des Thymozytenstadiums. Thymozyten differenzieren zu zwei verschiedenen Zellpopulationen, die aufgrund der unterschiedlichen Expression von Korezeptoren unterschieden werden. Thymozyten, die den Korezeptor CD4 ausprägen, differenzieren zu CD4+ Helfer-T-Zellen, während Thymozyten mit dem Korezeptor CD8 zu CD8+ zytotoxischen T-Zellen differenzieren.

Nur solche T-Zellen überleben, die einen funktionellen T-Zell-Rezeptor produzieren. T-Zellen unterliegen wie B-Zellen einer negativen Selektion. Sie durchlaufen zudem noch eine positive Selektion. Hierbei überleben nur solche T-Zellen, deren T-Zell-Rezeptor neben dem Antigen auch MHC-Moleküle binden kann. MHC-Moleküle werden von allen Körperzellen

gebildet. Mit ihrer Hilfe werden Peptidantigene auf der Zelloberfläche präsentiert. Eine T-Zell-vermittelte Immunantwort kann nur ausgelöst werden, wenn eine naive Antigen-spezifische T-Zelle durch die Wechselwirkung mit einer Antigen-präsentierenden Zelle, die das Antigen im Kontext von MHC-Molekülen präsentiert, aktiviert wird.

MHC-Moleküle können zwei unterschiedlichen Klassen zugeordnet werden. Klasse I MHC-Moleküle werden in allen Körperzellen gebildet. Sie werden normalerweise nur mit intrazellulär gebildeten Peptidantigenen beladen. Diese Klasse I MHC-Molekül - Peptid - Komplexe werden von zytotoxischen T-Zellen mit Hilfe ihres T-Zell-Rezeptors und des CD8-Korezeptors erkannt. Auf diese Weise identifizieren aktivierte CD8+ zytotoxische T-Zellen infizierte oder maligne Zellen und töten diese durch Ausschüttung lytischer Granula.

Helfer-T-Zellen erkennen mit Hilfe des CD4-Korezeptors Klasse II MHC-Moleküle. Diese werden nur von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen wie Makrophagen, B-Zellen oder DCs gebildet, die Antigene durch Phagozytose aus der Umgebung aufnehmen und Peptidteile dieser Antigene im Kontext von Klasse II MHC-Molekülen präsentieren. Bei der Aktivierung der Helfer-T-Zellen können diese zu zwei unterschiedlichen Subpopulationen, den T_H1 - und T_H2 -Zellen differenzieren. T_H1 -Zellen sezernieren das Zytokin $IFN-\gamma$, das Makrophagen, zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen stimuliert und die zelluläre Immunabwehr verstärkt. T_H2 -Zellen sezernieren hauptsächlich IL-4, wodurch B-Zellen aktiviert werden und die humorale Immunantwort gefördert wird. Eine weitere T-Zell-Subpopulation, die regulatorischen T-Zellen, sezernieren typischerweise IL-10 und den transformierenden Wachstumsfaktor (TGF) $-\beta$, die eine supprimierende Wirkung auf die Effektorzellen der zellulären Immunantwort haben.

In der Regel gehen aktivierte T- und B-Zellen in Apoptose, wenn sie keinen Kontakt mehr mit dem Antigen haben. Einige differenzieren allerdings zu langlebigen Gedächtniszellen, die bei erneutem Antigenkontakt unmittelbar reaktiviert werden und die Neuinfektion schnell unter Kontrolle bringen können. Dieses immunologische Gedächtnis verhilft somit zu einer andauernden Immunität und ist die Grundlage für den Erfolg von Impfstoffen.

1.1.3.3 NK-Zellen

NK-Zellen sind ebenfalls Lymphozyten, die wahrscheinlich aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle mit den T-Lymphozyten im Knochenmark hervorgehen. Als Bestandteil des angeborenen Immunsystems exprimieren sie keinen spezifischen Antigen-Rezeptor. NK-

Zellen stellen sehr effiziente zytotoxische Effektorzellen dar, deren Hauptaufgabe in der unspezifischen Erkennung und Eliminierung virusinfizierter Zellen liegt [8]. Zur Unterscheidung von normalen und infizierten Zellen exprimieren die NK-Zellen inhibitorische Rezeptoren, die Klasse I MHC-Moleküle auf der Oberfläche normaler Zellen erkennen. Diese Erkennung inhibiert die zytolytische Aktivität der NK-Zellen und schützt körpereigene Zellen vor einem Angriff. Zellen, die aufgrund einer Virusinfektion die Zelloberflächenexpression von MHC-Molekülen herunterregulieren und deshalb der Erkennung durch T-Zellen entgehen, werden jedoch von NK-Zellen erkannt und zerstört.

Zur Aktivierung der NK-Zellen benötigen diese, anders als die Antigen-spezifischen Lymphozyten, keinen vorangehenden Kontakt mit einem spezifischen Antigen. Sie werden als Reaktion auf die Freisetzung von IFN- α , IL-12 und IL-15 durch DCs und Makrophagen aktiviert. NK-Zellen exprimieren darüberhinaus auch eine Reihe aktivierender NK-Zell-Rezeptoren, die verschiedene bislang wenig charakterisierte Rezeptoren auf der Oberfläche von Zielzellen binden [9,10]. Wie zytotoxische T-Zellen töten die NK-Zellen infizierte Zellen durch Ausschüttung zytotoxischer Moleküle. Wie Neutrophile können auch NK-Zellen mit Hilfe von Fc-Rezeptoren Antikörper-opsonierte Zellen erkennen und eine Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität ausüben.

Die Rolle der NK-Zellen in der Tumorbekämpfung hat erst in den letzten Jahren allmählich wissenschaftliches Interesse erlangt. NK-Zellen können *in vitro* ohne vorherige Immunisierung eine Vielzahl hämatologischer Tumorzelllinien lysieren ohne normale Zellen zu schädigen [8,11].

1.1.4 Dendritische Zellen

Die DCs umfassen eine heterogene Gruppe verschiedener Subpopulationen, die in Abhängigkeit von ihrem Differenzierungs- und Reifungsstatus unterschiedliche Funktionen erfüllen. Hier wird zunächst auf die Differenzierung der DC-Populationen und die prinzipiellen Mechanismen des Reifungsprozesses eingegangen. Dabei wird die besondere Rolle der DCs im Immunsystem aufgrund ihrer Wechselwirkungen mit den anderen Zellen sowohl des adaptiven als auch des angeborenen Immunsystems herausgestellt.

1.1.4.1 Differenzierung der dendritischen Zellen

Die Vorläuferzellen der DCs gehen ebenfalls aus einer CD34+ hämatopoetischen Stammzelle des Knochenmarks hervor. Sie können sich zu unterschiedlichen DC-Subpopulationen

entwickeln, die myeloide und lymphoide DC-Populationen umfassen. Man geht davon aus, dass die unmittelbaren Vorläuferzellen der myeloiden DCs CD14⁺ Monozyten sind [12]. Diese können zu zwei unterschiedlichen DC-Subpopulationen, den Langerhanszellen und den interstitiellen DCs differenzieren [13,14].

Die Langerhanszellen migrieren als unreife DCs in die Epidermis, wo sie wie die Makrophagen sehr früh in Kontakt mit eindringenden Pathogenen kommen. Reife Langerhanszellen emigrieren dann aus der Haut in die nächstgelegenen Lymphknoten, präsentieren dort den T-Zellen aufgenommene Antigene und lösen in erster Linie eine spezifische zelluläre Immunantwort aus, indem sie T_H1-Zellen aktivieren. Die interstitiellen DCs migrieren zunächst in die Bindegewebe wie die Dermis oder zirkulieren im Blut. Als reife DCs lösen sie eher eine humorale Immunantwort aus, indem sie naive B-Zellen durch Zellkontakt zur Ausschüttung von Antikörpern stimulieren.

Eine weitere Population von DCs bilden die plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDCs). Ihr Name leitet sich von ihrer morphologischen und molekularen Ähnlichkeit zu lymphoiden Zellen ab. Sie unterscheiden sich im Wesentlichen von myeloiden DCs einerseits durch die geringere Expression myeloider Marker und andererseits durch die Expression des IL-3-Rezeptors CD123 sowie verschiedener Lymphozyten-assoziiierter Marker [15,16]. Möglicherweise gehen plasmazytoide DCs aus einer mit den Lymphozyten gemeinsamen Progenitorzelle hervor. Andererseits können DCs mit plasmazytoiden DC-Eigenschaften auch aus myeloiden Vorläuferzellen hervorgehen [12].

Plasmazytoide DCs residieren in der Regel nicht in den peripheren Geweben und haben eine geringere Kapazität zur Phagozytose. Sie zirkulieren im Blut und migrieren von dort direkt in die Lymphknoten. Als unreife DCs können sie T_H2-Zellen und regulatorische T-Zellen aktivieren. Nach einer Virusinfektion setzen plasmazytoide DCs jedoch extrem große Mengen IFN- α frei und aktivieren hierdurch zytotoxische Effektorzellen wie NK-Zellen [17,18]. Reife plasmazytoide DCs präsentieren den T-Zellen in den Lymphknoten virale Antigene oder Tumorantigene und können eine spezifische T_H1-Immunantwort gegen diese Antigene induzieren.

Alle DC-Populationen zeichnen sich dadurch aus, dass sie einen Reifungsprozess durchlaufen, bei dem sich die phänotypischen und funktionellen Eigenschaften der DCs ändern. Die **Abbildung 1.3** fasst diese Veränderungen schematisch zusammen.

1.1.4.2 Phänotyp und Funktionen unreifer dendritischer Zellen

Die Hauptfunktion unreifer DCs ist die Aufnahme von exogenen Antigenen in den peripheren Geweben oder im Blut. DCs exprimieren dazu zahlreiche Mustererkennungsrezeptoren wie Toll-Rezeptoren (*Toll-like receptors*, TLRs), die beispielsweise bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) oder doppelsträngige virale RNA erkennen können [19], sowie C-Typ-Lektine wie den Mannose-Rezeptor [20]. Ausserdem exprimieren DCs Rezeptoren für Immunglobuline (Fc-Rezeptoren), mit denen sie Antikörper-opsonierte Partikel oder Zellen binden können, sowie Faktoren und Rezeptoren des Komplementsystems [21].

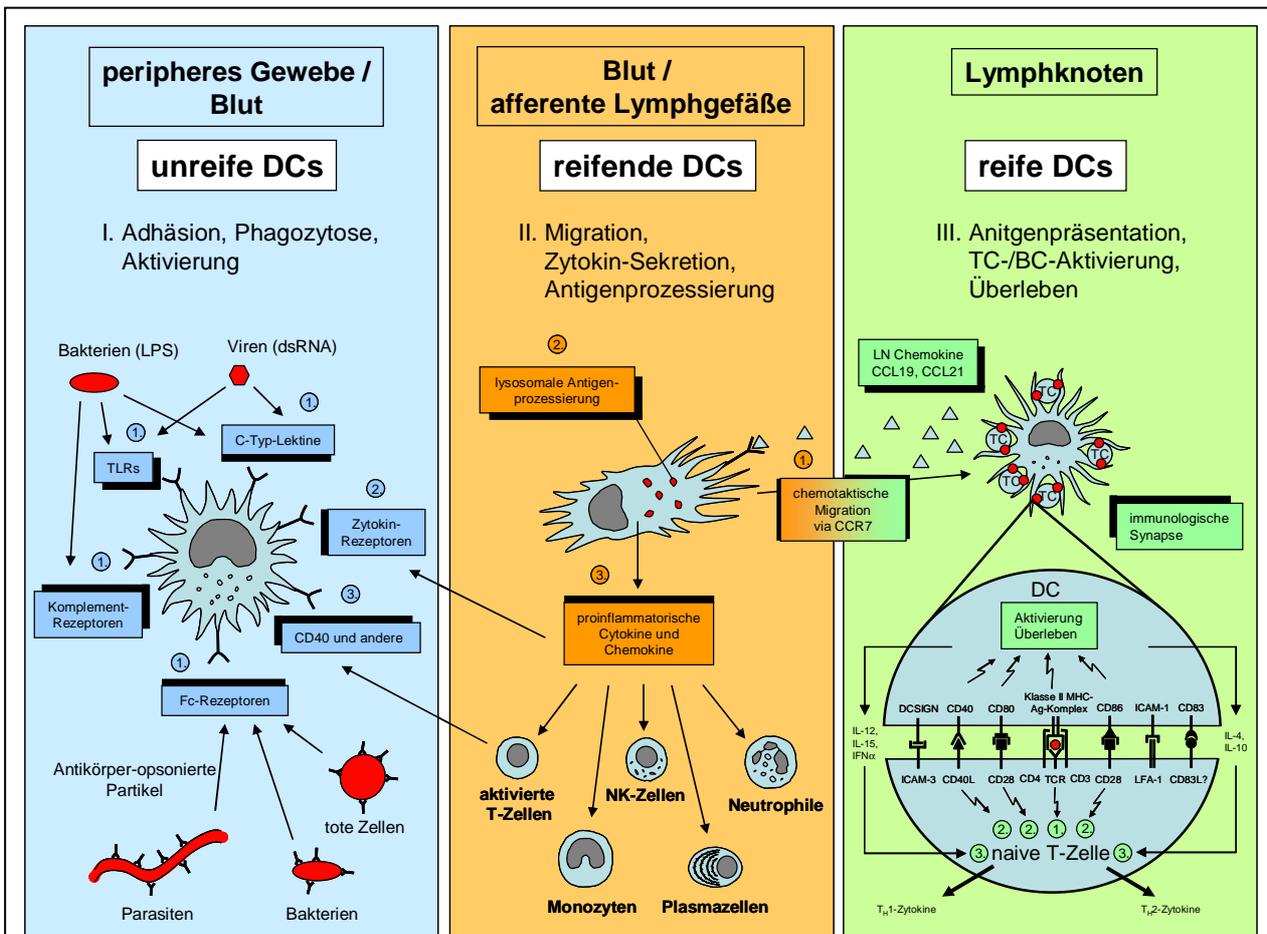


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der molekularen, phänotypischen und funktionellen Eigenschaften der DCs während des Reifungsprozesses. Unreife DCs residieren in den Geweben oder zirkulieren im Blut (blauer Kasten), wo sie Antigene erkennen und durch Phagozytose aufnehmen. Signale, die durch Rezeptoren für die Antigenerkennung (1.), Zytokin-Rezeptoren (2.) und andere Rezeptoren wie CD40 (3.) vermittelt werden, leiten den Reifungsprozess der DCs ein. Reifende DCs migrieren über die Lymphgefäße (oranger Kasten) in die nächstgelegenen Lymphknoten. Sie zeichnen sich durch die Expression des Chemokin-Rezeptors CCR7 (1.), sowie von lysosomalen Proteinen für die Antigenprozessierung (2.) und von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (3.) aus. Reife DCs finden sich schließlich in den Lymphknoten, wo sie naiven T-Zellen Antigene präsentieren und diese Zellen aktivieren (grüner Kasten), indem sie mit ihnen eine immunologische Synapse ausbilden. Für die vollständige Aktivierung naiver T-Zellen sind drei Signale erforderlich: die Erkennung des MHC-Molekül – Peptid – Komplexes auf den DCs durch den Antigen-spezifischen T-Zell-Rezeptor (1.), die Wechselwirkung von kostimulatorischen Molekülen der DCs mit deren Liganden auf den T-Zellen (2.) und die Ausschüttung von Zytokinen durch die DCs (3.).

Die Stimulierung dieser Rezeptoren führt zur Phagozytose der gebundenen Partikel. Das aufgenommene Material akkumuliert in speziellen intrazellulären Vesikeln, sogenannten Klasse II MHC-Kompartimenten (MIIC), wo neben Klasse II MHC-Molekülen auch lysosomale Enzyme koexprimiert werden [22]. Dort wird das aufgenommene Material nicht vollständig abgebaut, sondern enzymatisch zu kurzen Peptidfragmenten prozessiert. Diese Peptidantigene werden dann von Klasse II MHC-Molekülen gebunden. Diese Klasse II MHC-Molekül – Peptid - Komplexe werden schließlich zur Zelloberfläche transportiert [23].

Als weiterer Schritt zur Aktivierung der DCs sind zusätzliche proinflammatorische Signale notwendig. Hierzu exprimieren unreife DCs verschiedene Rezeptoren für proinflammatorische Zytokine. Solche Zytokine sind TNF- α , Interferone, IL-1 β und IL-18, die im Zuge einer Entzündungsreaktion beispielsweise von Keratinozyten und angelockten Immunzellen sezerniert werden [24]. Bleiben diese Signale aus, werden antiinflammatorische Zytokine wie etwa IL-10 oder TGF- β durch unreife DCs freigesetzt. Dies führt zur Inaktivierung von T-Zellen und zur Differenzierung von regulatorischen T-Zellen, die eine Immunantwort verzögern oder verhindern können [25].

Ein dritter bekannter Mechanismus zur Aktivierung von DCs wird durch direkten Zell-Zell-Kontakt über die Interaktion des Zelloberflächenrezeptors CD40 auf DCs mit CD40 Ligand (CD40L), der auf aktivierten T Zellen exprimiert wird, vermittelt [26]. Zur optimalen Einleitung der Reifung von DCs ist die Anwesenheit mehrerer der genannten Signale notwendig.

1.1.4.3 Reifung der dendritischen Zellen

Es ist nicht vollständig geklärt, welche Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren durch die verschiedenen Rezeptoren im Zuge der Reifung von DCs aktiviert werden. Genexpressionsanalysen zeigten, dass wahrscheinlich verschiedene überlappende Signalwege synergistisch in der Induktion reifungsassoziierter Gene wirken [27]. Drei Gruppen von Transkriptionsfaktoren sind im Wesentlichen am Reifungsprozess der DCs beteiligt. Unter der Kontrolle von NF κ B stehen u.A. die Gene für verschiedene Zytokine und kostimulatorische Moleküle [28]. NF κ B wird z.B. durch Signale von TLRs oder den Rezeptoren für TNF- α und IFN- α aktiviert. Eine zweite Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die für den Reifungsprozess der DCs eine wichtige Rolle spielen, sind die Signalüberträger und Aktivatoren der Transkription (STATs), insbesondere STAT1 [29]. STATs werden über die mit den Zytokin-Rezeptoren assoziierten Tyrosinkinasen der Janus-Kinase-Familie (Jak)

aktiviert. Eine dritte Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die Interferon-regulatorischen Faktoren (IRF), die die Expression der IFN- α -Gene kontrollieren, trägt ebenfalls zur Reifung von DCs bei [30]. Diese werden durch TLR- oder IFN- α -Rezeptor-vermittelte Signale aktiviert.

Der Reifungsprozess führt in DCs zur Herunterregulierung von Phagozytose-assoziierten Genen. Das hochorganisierte, subkortikale Aktin-Zytoskelett unreifer DCs wird depolymerisiert, und fokale Adhäsionsstrukturen gehen verloren [31]. Für die Migration in die Lymphknoten exprimieren reife DCs den Chemokin-Rezeptor CCR7 [32]. Die Bindung der Chemokine CCL19 und CCL21, die von Endothelzellen und DCs in den Lymphknoten sezerniert werden, an diesen Rezeptor führt zur chemotaktischen Anlockung reifer DCs über die afferenten Lymphgefäße in die Lymphknoten. CCR7 wird auch von naiven T-Zellen exprimiert. Dieser Rezeptor ist also eine wichtige Voraussetzung für den Kontakt reifer DCs mit naiven T-Zellen und die Einleitung einer primären Antigen-spezifischen Immunantwort [33].

Die zweite Voraussetzung für die Einleitung einer primären Immunantwort ist die Expression von Enzymen, die die Beladung und Exposition Antigen-präsentierender Moleküle katalysieren. Reife DCs zeichnen sich durch eine hohe Dichte an Klasse II MHC-Molekül – Peptid - Komplexen auf der Zelloberfläche aus [22,23]. Parallel werden auch die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 sowie andere interzelluläre Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und CD83 auf der Zelloberfläche hochreguliert.

Eine dritte wesentliche Qualität von reifen, aktivierten DCs ist die Fähigkeit, ihrerseits proinflammatorische Zytokine zu sezernieren, die andere Immunzellen zur Proliferation und Differenzierung anregen. Zu ihnen zählen IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-15, TNF- α und Interferone [34]. Ausserdem sezernieren sie eine Vielzahl von Chemokinen, die andere Leukozyten anlocken und aktivieren können [35].

1.1.4.4 Aktivierung naiver Antigen-spezifischer T-Zellen durch dendritische Zellen

Reife, aktivierte DCs treten schließlich in den Lymphknoten in engen Kontakt mit naiven T-Zellen. Kommt eine DC in unmittelbare Nachbarschaft einer T-Zelle, deren T-Zell-Rezeptor das präsentierte Antigen binden kann, bilden die beiden Zellen eine immunologische Synapse aus [36]. Diese Struktur wird durch die Interaktion verschiedener interzellulärer Adhäsionsmoleküle der DC mit den entsprechenden Liganden der T-Zelle aufrechterhalten, wie in **Abbildung 1.3 rechts unten** schematisch dargestellt ist.

Zur Aktivierung und der klonalen Expansion einer naiven T-Zelle sind drei unabhängige Signale erforderlich, ohne die die T-Zelle in einen anergen, nicht-proliferativen Zustand versetzt wird. Das erste Signal wird durch die Erkennung des MHC – Peptid - Komplexes durch den T-Zell-Rezeptor und den Korezeptor vermittelt. Das zweite Signal erfolgt durch die Bindung der wichtigsten kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 an den auf der T-Zelle exprimierten Liganden CD28 [37]. Verstärkt wird dieses Signal zusätzlich durch die Wechselwirkung von CD40 mit CD40L [26]. Die Kombination dieser beiden Signale induziert in der T-Zelle u.A. die Expression von IL-2 und seinem Rezeptor. Durch die autokrine Bindung von IL-2 wird die klonale Expansion der Antigen-spezifischen T-Zelle angeregt [38].

Schließlich bedarf es zur vollständigen Aktivierung naiver T-Zellen eines dritten Signals durch Zytokine, die von DCs und anderen Immunzellen sezerniert werden [39]. Wichtig für die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu T_H1-Zellen sind die Zytokine IL-12 sowie IFN- γ und IFN- α , während die Anwesenheit von IL-4 dagegen die Differenzierung von T_H2-Zellen stimuliert [40,41]. Die Proliferation und zytotoxische Aktivität von CD8⁺ T-Zellen wird vor Allem durch die Signalwirkung von IL-15 sowie Interferonen stimuliert [42,43].

1.1.4.5 Wechselwirkung der dendritischen Zellen mit NK-Zellen

Neben den Zellen des adaptiven Immunsystems können DCs durch Ausschüttung von Chemokinen auch die Effektorzellen des angeborenen Immunsystems rekrutieren [44]. Besondere Aufmerksamkeit wurde in letzter Zeit der Wechselwirkung von DCs und NK-Zellen gewidmet [45,46]. Beide können in direkten Zell-Zell-Kontakt miteinander treten. Die NK-Zelle vermittelt dabei Signale, die eine verstärkte Reifung der DCs bewirken. Diese sezernieren daraufhin Zytokine wie IL-12, IL-15, IL-18 und IFN- α und können dadurch ihrerseits die zytotoxische Aktivität der NK-Zelle verstärken. Der Mechanismus dieser wechselseitigen Aktivierung ist jedoch nicht völlig geklärt. Möglicherweise spielen CD40 und CD80 sowie der NK-Zell-Rezeptor NKp30 dabei eine Rolle [47,48]. Unreife DCs können von NK-Zellen auch abgetötet werden, während reife DCs hingegen resistent sind [49]. Möglicherweise wird so sichergestellt, dass die effektive zelluläre Immunantwort nach einer Infektion nicht durch die Wirkung tolerogener unreifer DCs gestoppt wird.

Interessanterweise haben neuere Beobachtungen gezeigt, dass NK-Zellen sowie andere Zellen des angeborenen Immunsystems wie Neutrophile Eigenschaften von DCs erwerben können [50,51]. Diese Zellen exprimieren nach der zytotoxischen Reaktion gegen Zielzellen

Klasse II MHC- und kostimulatorische Moleküle und können Antigen-spezifische T-Zellen aktivieren. Andererseits wurden auch DCs beschrieben, die zytotoxische Eigenschaften ähnlich wie NK-Zellen zeigten [52]. Es konnte gezeigt werden, dass aktivierte plasmazytoide DCs und myeloide DCs Tumorzelllinien *in vitro* abtöten können [53,54].

Zwei Arbeitsgruppen haben kürzlich einen neuen, eigenen Zelltyp in Mäusen beschrieben, der phänotypische und funktionelle Eigenschaften von plasmazytoiden DCs und NK-Zellen vereint [55,56]. Diese sogenannten Interferon-produzierenden Killer-dendritischen Zellen (IKDCs) erwarben nach Kontakt mit Tumorzellen oder nach Stimulation durch CpG-haltige Oligonukleotide eine zytotoxische Aktivität gegen diese Tumorzellen. Anschließend exprimierten sie MHC- und kostimulatorische Moleküle, migrierten in die Lymphknoten, aktivierten Antigen-spezifische T-Zellen und konnten eine spezifische Immunantwort gegen die Tumorzellen auslösen. IKDCs konnten auf diese Weise das Tumorstadium kontrollieren.

Diese Beobachtungen machen die Rolle der DCs als zentrales Bindeglied zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem deutlich. DCs sind einerseits wichtige angeborene Effektorzellen. Sie erfüllen andererseits auch die Funktion, Antigen-spezifische Effektorzellen zu aktivieren und somit eine langfristige systemische Immunität zu erzeugen. Daher sind DCs mit beiden Eigenschaften von wichtiger Bedeutung für die Generierung Zell-basierter Vakzine.

1.2 Vakzinierungsstudien mit DCs bei malignen Erkrankungen

Heute hofft man, mit neuen Therapien die Chemotherapie, die starke toxische Nebenwirkungen verursacht, ergänzen oder ersetzen zu können. Die allogene Blutstammzelltransplantation ist der Beweis, dass mit einer immunologischen Therapie bösartige Krankheiten geheilt werden können. Diese Therapieform ist jedoch mit schweren Nebenwirkungen verbunden [57]. Eine Zelltherapie mit DCs ist hingegen eine schonende Behandlung, mit dem Ziel, eine immunologische Reaktion gegen maligne Zellen hervorzurufen und eine langfristige Immunität aufzubauen, die eine erneute Vermehrung der malignen Zellen verhindert.

1.2.1 Konventionelle Protokolle zur Herstellung von dendritischen Zellen für Vakzinierungsansätze

Da DCs nur in geringer Zahl im peripheren Blut vorhanden sind und zudem ein eingeschränktes Zellteilungsvermögen haben, ist es effektiver, für Vakzinierungsstudien DCs *ex vivo* in großem Maßstab zu generieren. Ein essenzieller Faktor für die Differenzierung und das Überleben von kultivierten DCs ist GM-CSF [58]. Mitte der neunziger Jahre zeigten mehrere Arbeitsgruppen, dass sich DCs *in vitro* durch Inkubation von selektionierten CD34+ Stammzellen mit GM-CSF und TNF- α [13,14] oder mononukleären Zellen (MNCs) mit GM-CSF und IL-4 [59] differenzieren lassen. Durch Zugabe von Monozyten-konditioniertem Medium, in dem Zytokine wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 nachgewiesen wurden, konnten auch reife DCs generiert werden [60]. Zhou und Tedder konnten 1996 reife DCs gewinnen, indem sie plastik-adhärenente Monozyten über 7 Tage mit GM-CSF- und IL-4-haltigem Medium in Anwesenheit von TNF- α kultivierten [61].

In den vergangenen 10 Jahren wurden verschiedene Protokolle zur *in vitro* Generierung von DCs entwickelt. Das Standardverfahren besteht heute aus der Isolierung von Monozyten, die über 4 bis 6 Tage mit GM-CSF und IL-4 behandelt werden. Die resultierenden unreifen DCs werden dann mit einem Antigen inkubiert und anschließend zur Reifung über ein bis zwei Tage mit TNF- α oder einem Zytokin-Gemisch behandelt.

Als Antigene können einerseits genau definierte Tumorantigene wie beispielsweise die Lymphom-assoziierten Idiotyp (Id)-Antigene oder das Melanom assoziierte Antigen MAGE3 sowie virale Peptide verwendet werden. Die Beladung von DCs mit einzelnen Peptidantigenen ermöglicht die Induktion einer selektiven, spezifischen Immunantwort gegen dieses Antigen. Andererseits können DCs auch mit Tumorlysaten inkubiert werden, damit sie mehrere Tumor-assoziierte Antigene präsentieren und polyklonale und damit stärkere Immunantworten auslösen. Die Beladung mit Zelllysaten birgt jedoch aufgrund der Anwesenheit normaler körpereigener Proteine die Gefahr, Autoimmunreaktionen hervorzurufen.

Der erste Beleg (*proof-of-principle*) für die stärkere Immunogenität von DC-Vakzinen gegenüber löslichen Antigenen wurde 1999 von Dhodapkar *et al.* erbracht [62]. Sie konnten nachweisen, dass gesunde Menschen nach einer einmaligen Injektion von DCs, die mit Tetanus Toxoid (TT), *Keyhole Limpet* Hämocyanin (KLH) oder einem Matrixprotein des Influenzavirus beladen wurden, innerhalb einer Woche eine Antigen-spezifische T-Zell-vermittelte Immunantwort zeigen. Die einmalige Injektion dieser Antigene ohne DCs hatte

dagegen noch keine immunogene Wirkung. Eine nachweisbare Immunreaktion kann mit löslichem Antigen ohne DCs erst nach mehreren Injektionen erreicht werden.

Bis heute wurden in einer Vielzahl verschiedener klinischer Studien mehr als 1.000 Patienten mit Tumor- oder Infektionserkrankungen mit DC-Vakzinen behandelt (zur Übersicht siehe Nestle *et al.* 2005 und Reichardt *et al.* 2004 [63,64] sowie unter www.mmri.mater.org.au). Viele Arbeitsgruppen konnten ein immunologisches Ansprechen der Patienten auf die DC-basierte Therapie zeigen. Aber nur eine kleine Zahl von Patienten zeigte Hinweise auf eine Reduktion der Krankheitsaktivität. Die wichtigsten klinischen Studien sind in **Tabelle 6.1** im Anhang zusammengefasst.

Die bislang größten Erfolge mit spezifischen Vakzinen konnten bei Patienten mit follikulärem B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) erzielt werden. Hsu *et al.* zeigten bereits 1997, dass die sequenzielle Verabreichung von löslichem Idiotyp-Protein, das an KLH gekoppelt war (Id-KLH), bei 49 % der behandelten Patienten Idiotyp-spezifische T-Zellen aktivierte und / oder die Freisetzung Idiotyp-spezifischer Antikörper induzierte [65]. Patienten, die eine solche Immunantwort aufwiesen, zeigten ein signifikant längeres medianes progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben als Patienten, bei denen keine Idiotyp-spezifische Immunantwort nachgewiesen wurde. Um die Häufigkeit und Stärke dieser Immunantworten zu erhöhen, wurden daraufhin in einer weiteren Studie insgesamt 35 Patienten mit B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom Idiotyp-beladene DCs verabreicht [66,67]. Bei 66 % der Patienten wurde eine T-Zell- und / oder Antikörper-vermittelte Immunantwort detektiert. Bei insgesamt 10 von 28 Patienten (36 %) konnte eine objektive Reduktion der Tumorzellzahl beobachtet werden. Eine komplette Remission bei zwei dieser Patienten konnte nach *Booster*-Injektionen von löslichem Id-KLH erreicht werden, obwohl sie nach der Vakzinierung mit DCs noch Tumorzellen aufwiesen oder einen Progress hatten. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass die Patienten Gedächtniszellen entwickelt hatten.

Die Studie zeigte, dass Idiotyp-spezifische DC-Vakzine gegenüber löslichen Peptid-Vakzinen häufiger Immunreaktionen hervorrufen können. Sie können dauerhafte Tumorregressionen auslösen, die durch *Booster*-Injektionen von löslichem Peptid verstärkt werden. Das progressionsfreie und Gesamtüberleben der Patienten, die mit Chemotherapie und DCs behandelt wurden, war länger als das historischer Kontrollgruppen, die nur mit Chemotherapie behandelt wurden.

Aufgrund der Erfolge bei Patienten mit B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom erhoffte man sich ähnlich vielversprechende Ergebnisse bei der Vakzinierung von Patienten mit anderen malignen B-Zell-Erkrankungen wie dem Multiplen Myelom. Bis heute wurden 8 Arbeiten

veröffentlicht, in denen insgesamt 63 Patienten mit Multiplem Myelom mit Idiotyp-beladenen DCs behandelt wurden [68-75] (vgl. auch **Tabelle 6.1**). Bei fast allen Patienten konnte eine spezifische Immunantwort gegen das Kontrollantigen KLH nachgewiesen werden. Etwa 40 % aller Patienten zeigten Idiotyp-spezifische T-Zellen oder Antikörper. Diese Ergebnisse zeigen, dass mit DC-Vakzinen auch in Patienten mit Multiplem Myelom Anti-Tumor-Immunantworten ausgelöst werden können. Ein klinisches Ansprechen konnte jedoch nur bei zwei Patienten, die eine partielle Remission zeigten, beobachtet werden. Eine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens gegenüber historischen Kontrollgruppen konnte bislang in keiner Studie demonstriert werden [76,77].

Weitere DC-basierte Vakzinierungsstudien wurden erfolgreich bei Patienten mit fortgeschrittenem malignem Melanom unter Verwendung Melanom-assoziiertes Antigen wie MAGE3 oder Melan A durchgeführt. Bei vielen Patienten konnten hier ebenfalls Antigen-spezifische Immunantworten ausgelöst werden. In einigen Fällen konnte ein Rückgang von Metastasen beobachtet werden [78-80].

Wichtige Erfolge konnten auch bei Patienten mit HIV verzeichnet werden. So konnte beispielsweise bei 8 von 18 Patienten mit chronischer HIV-Infektion nach der Vakzinierung mit DCs, die mit inaktivierten HI-Viren beladen wurden, ein Rückgang der Viruszahl um mehr als 90 % für über ein Jahr erreicht werden [81].

Die Ergebnisse der Vakzinierungsstudien, insbesondere bei Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom, bestätigen, dass DC-basierte Vakzine eine vielversprechende Therapiemöglichkeit zur Behandlung von Tumor-Patienten darstellen. Dennoch konnten nur bei einem Teil der Patienten spezifische Immunantworten hervorgerufen werden. Dies liegt zum Teil daran, dass bei vielen Erkrankungen ein funktionelles Defizit der DCs vorliegt. Native DCs von Patienten mit Multiplem Myelom zeichnen sich beispielsweise durch eine verminderte Kapazität aus, kostimulatorische und Antigen-präsentierende Moleküle hochzuregulieren und T-Zellen zu stimulieren [82]. Aus der geringen Immunogenität von DCs bei einigen Patienten leitet sich die Notwendigkeit ab, zukünftig verbesserte Protokolle zur Generierung von DC-basierten Vakzinen zu etablieren. Dabei spielt die Erkrankung eine besondere Rolle, so dass unterschiedliche Protokolle für unterschiedliche Erkrankungen gesucht werden müssen.

1.2.2 Generierung von dendritischen Zellen mit IFN- α

Ein Zytokin, das für ein alternatives Protokoll zur Generierung von DCs geeignet erscheint, ist IFN- α . Dieses Zytokin hat ein breites Wirkungsspektrum. Einerseits wirkt es

antiproliferativ auf virusinfizierte Zellen sowie Tumorzellen. Deswegen wird es als Medikament bei Patienten mit chronischen, viralen Infektionen wie Hepatitis sowie Tumorerkrankungen eingesetzt [83,84]. Darüberhinaus übt es eine aktivierende Wirkung auf eine Vielzahl von Immunzellen wie NK-Zellen, zytotoxische T-Zellen, B-Zellen und DCs aus [85]. Die therapeutische Wirkung von IFN- α kann daher wahrscheinlich auch auf diese Effekte zurückgeführt werden.

Die physiologische Bedeutung von IFN- α für die Differenzierung und Reifung von DCs wurde in Mäusen demonstriert, die keinen IFN- α -Rezeptor exprimieren. Die DCs dieser Mäuse wiesen eine reduzierte Kapazität zur phänotypischen und funktionellen Reifung auf [86]. Zudem wurde gezeigt, dass die erhöhte Produktion von IFN- α in Patienten mit *Systemischem Lupus Erythematosus*, einer Erkrankung aus dem Formenkreis der Kollagenosen, zur gesteigerten Differenzierung und Reifung von DCs aus Monozyten führt [87]. Diese DCs aktivieren autoreaktive T- und B-Zellen, die für die Symptome dieser Autoimmunerkrankung verantwortlich sind.

Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, dass mit IFN- α DCs hergestellt werden können [88-99]. Paquette *et al.* demonstrierten 1998, dass Monozyten in Anwesenheit von GM-CSF und IFN- α zu DCs mit einer typischen DC-Morphologie und starker Expression von kostimulatorischen Molekülen differenzieren [94]. IFN-DCs zeigten darüberhinaus im Gegensatz zu IL-4-DCs ein stärkeres Potenzial zur Stimulation von Tetanus-Toxin-spezifischen, autologen T-Zellen. Dies wies darauf hin, dass IFN-DCs bereits Eigenschaften von reifen DCs besitzen. Andere Arbeitsgruppen konnten den DC-Phänotyp von IFN-DCs bestätigen und zeigen, dass IFN-DCs eine stärkere Expression von kostimulatorischen Molekülen aufwiesen und effektiver Antigene präsentierten als unreife IL-4-DCs. Santini *et al.* demonstrierten 2000, dass IFN-DCs Zytokine wie IL-15 und TNF- α exprimieren und darüberhinaus effektiv sowohl T-Zell-vermittelte als auch humorale Immunantworten auslösen können [97]. In weiteren Arbeiten wurde bestätigt, dass IFN-DCs einen fortgeschritteneren Reifungsstatus als IL-4-DCs aufweisen, der durch eine stärkere Expression des Reifemarkers CD83 [89,97], eine stärkere Migration [95] und eine effektivere Induktion Antigen-spezifischer T-Zellen und Antikörper [91,92] gekennzeichnet ist. In verschiedenen anderen Studien wurde zudem beobachtet, dass die Zugabe von IFN- α auch die Reifung von IL-4-DCs mit TNF- α verstärken kann [100,101].

Andererseits wurden auch inhibierende Effekte von IFN- α auf die Differenzierung und Reifung von DCs in Anwesenheit von GM-CSF und IL-4 beschrieben. Dies wurde in zwei Arbeiten von Dauer *et al.* sowie McRae *et al.* diskutiert [102,103]. Sie beschrieben, dass mit

IFN- α und GM-CSF behandelte Monozyten keine phänotypischen und funktionellen DC-Eigenschaften ausprägen und IL-4-DCs in Anwesenheit von IFN- α eine reduzierte Reifung durch TNF- α zeigen, da sie eine verminderte Kapazität besitzen, IL-12 zu sezernieren und eine T_H1 Immunantwort zu induzieren.

Die Ergebnisse der beschriebenen Arbeiten weisen aber insgesamt vielmehr darauf hin, dass IFN- α die Differenzierung und Reifung von DCs über andere molekulare Mechanismen als IL-4 und TNF- α induziert und daher möglicherweise eine sich von IL-4 / TNF-DCs unterscheidende DC-Population mit potenten immunstimulatorischen Funktionen erzeugt.

In allen bislang veröffentlichten Untersuchungen wurden IFN-DCs stets in Serumhaltigem Medium hergestellt. Da der Zusatz von Serum, das unbekannte lösliche Faktoren beinhalten kann, bei verschiedenen Patienten unterschiedlichen Einfluss auf die Differenzierung von DCs ausüben kann, ist ein solcher Zusatz für den klinischen Einsatz ungeeignet. Zudem wurden IFN-DCs in allen Arbeiten direkt mit unreifen IL-4-DCs verglichen und vielfach ihre funktionelle Überlegenheit gegenüber diesen unbehandelten IL-4-DCs herausgestellt. Ein direkter Vergleich von IFN-DCs mit TNF- α -behandelten IL-4-DCs, die heute standardmäßig in Vakzinierungsstudien eingesetzt werden, unter serumfreien Bedingungen steht aber noch aus.

Neben den beschriebenen funktionellen Eigenschaften besitzen IFN-DCs einen entscheidenden Vorteil. Sie können in einem einzigen, nur dreitägigen Zellkulturschritt, d.h. weniger kosten- und arbeitsaufwendig hergestellt werden als herkömmliche IL-4 / TNF-DCs, die eine 7-tägige Kultur mit einem zusätzlichen Reifungsschritt benötigen. Darüberhinaus kann man spekulieren, dass IFN-DCs bei Patienten mit einer Erkrankung, die auf eine Therapie mit IFN- α anspricht, besonders gut wirken können. Eine solche Krankheit ist das Multiple Myelom.

1.3 Das Multiple Myelom

Das Multiple Myelom ist eine maligne B-Zell-Erkrankung, die durch einen Plasmazellklon im Knochenmark charakterisiert ist. Gewöhnlich produziert dieser Klon ein monoklonales Immunglobulin. Das Multiple Myelom ist die dritthäufigste hämatologische Erkrankung in westlichen Ländern und tritt in der Regel jenseits des fünfzigsten Lebensjahres auf. Die Ursache der Krankheit ist nicht bekannt.

Die Expansion des malignen Plasmazellklons im Knochenmark führt zu einer Unterdrückung des blutbildenden Gewebes und in Folge zu einer reduzierten Zahl an

Erythrozyten (Anämie), Leukozyten (Leukozytopenie) und Thrombozyten (Thrombozytopenie). Daher leiden die Patienten unter Belastungsschwäche, häufigen Infektionen und Blutungen. Zudem wird die Funktion des Knochenstoffwechsels dysreguliert, so dass es zu multiplen Osteolysen und pathologischen Knochenfrakturen kommt. Die kontinuierliche Freisetzung Klon-spezifischer Antikörper führt darüberhinaus zu Paraproteinablagerungen in der Niere, im Herzen und in Nervenzellen, was Nieren- und Herzinsuffizienzen sowie Polyneuropathien zur Folge hat.

Patienten mit Multiplem Myelom können mit Hilfe der Chemotherapie nicht geheilt werden. Die mittlere Überlebenszeit der Patienten beträgt trotz Therapie etwa 66 Monate. Bei Patienten bis 65 Jahre wird als Standardprimärtherapie die Hochdosis-Chemotherapie (HDT) mit nachfolgender autologer Blutstammzelltransplantation (SZT) durchgeführt [104,105]. Nach der Hochdosis-Chemotherapie wird u.A. IFN- α als Erhaltungstherapie eingesetzt, womit jedoch nur ein geringer Überlebensvorteil erzielt werden kann [106]. Die Patienten werden auch mit neueren immunomodulatorischen Substanzen wie Thalidomid oder Bortezomib in Kombination mit Chemotherapie oder allein behandelt [107,108].

Keine der genannten Therapien kann jedoch eine Heilung der Erkrankung bewirken. Die Patienten entwickeln nach einer vorübergehenden Remission von unterschiedlicher Dauer immer ein Rezidiv und sterben letztendlich an ihrer Erkrankung. Die Ursprungszellen eines solchen Rezidivs sind eine kleine Zahl persistierender Tumorzellen, die minimale Resterkrankung (MRD), die der zytotoxischen Wirkung der vorangegangenen Therapie entgangen sind [109].

Molekularbiologisch lässt sich der maligne Plasmazellklon eindeutig durch seinen spezifischen Idiotyp identifizieren, der durch die somatische Rekombination und Hypermutationen der variablen Region der Immunglobulinketten festgelegt ist (vgl. **Abbildung 1.2**). Die Kenntnis dieser individuellen Sequenz einzelner Patienten ermöglicht einen quantitativen Nachweis der Tumorzellen in Blut- oder Knochenmarkproben mit Hilfe einer Real-Time-PCR unter Verwendung von Patienten- und Tumor-spezifischen Primern [110,111]. Die sensitive Detektion einer minimalen Resterkrankung mit dieser Technik ermöglicht zudem die frühzeitige Detektion und Behandlung eines Rezidivs.

1.4 Fragestellungen

Auf dem Weg zur Entwicklung einer schonenden immunologischen Therapie neben der konventionellen Chemotherapie bei Patienten mit malignen Erkrankungen bietet sich eine Vakzinierung mit DCs und Tumorantigenen an. Die herkömmliche Methode mit IL-4 / TNF-DCs brachte bislang bei vielen Patienten keine positiven Ergebnisse. Daher soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob IFN-DCs möglicherweise spezielle Eigenschaften besitzen, die eine effektive Anti-Tumor-Immunantwort auslösen können, insbesondere bei Patienten, die auf eine Therapie mit IFN- α ansprechen.

Hierzu sollen DCs, die mit GM-CSF und IFN- α hergestellt wurden, mit konventionellen DCs verglichen werden, die mit GM-CSF und IL-4 / TNF- α generiert wurden. Die phänotypischen und funktionellen Eigenschaften der DCs sollen mit Hilfe verschiedener immunologischer Techniken und Zellkulturexperimenten untersucht werden. Die Unterschiede der beiden DC-Präparationen sollen insbesondere anhand der Erstellung eines Genexpressionsprofils auf molekularem Niveau erkannt und bestätigt werden.

Zuletzt sollen diese DCs im klinischen Einsatz bei Patienten mit Multiplem Myelom eingesetzt werden. Das Ansprechen auf die Therapie soll anhand eines serologischen Parameters und des quantitativen, molekularbiologischen Nachweises von Tumorzellen in Blut- und Knochenmarkproben der Patienten untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Probanden und Zellmaterial

Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung von Monozyten für die Herstellung von DCs wurden *Buffy-Coats* à 60-100 ml verwendet. Diese wurden im Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf aus dem venösen Blut anonymen Spender hergestellt. Für funktionelle Tests wurden die mononukleären Zellen (MNCs) aus peripherem Blut eines gesunden Spenders gewonnen, das in Zitrat-Röhrchen gesammelt wurde. MNCs für die Sequenzermittlung der CDR3-Region des IgH-Lokus und die quantitative Bestimmung der MRD wurden aus EDTA-Blut und Knochenmark von Patienten mit Multiplem Myelom gewonnen. Alle Spender von Zellmaterial haben ihr Einverständnis zur Verwendung des Materials für wissenschaftliche Zwecke gegeben.

Die humane erythroblastäre-chronisch-myeloische-Leukämie-Zelllinie K562 sowie die humane Lymphom-B-Zelllinie MHH-PREB-1 wurden freundlicherweise von Dr. R. Sorg am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

2.2 Materialien

2.2.1 Geräte und Software

<i>ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System Instrument</i>	Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH (Darmstadt)
<i>ABI PRISM Software</i>	Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH (Darmstadt)
<i>Agilent 2100 Bioanalyzer</i>	Agilent Technologies (Waldbronn)
<i>Agilent GeneArray Scanner 2500A</i>	Agilent Technologies (Waldbronn)
<i>Beta-Szintillations-Counter MicroBeta TriLux</i>	Wallac (Turku, Finnland)
<i>Cryobox Cryo 1 freezing container</i>	Nalgene (Neerijse, Belgien)
<i>Cycler Mastercycler gradient</i>	Eppendorf (Hamburg)
<i>Färbe-Automat Stainingmaster 2030</i>	Bavimed (Birkenau)
<i>Farbvideokamera 3CCD</i>	Sony
<i>Filtermate Harvester</i>	Packard Bioscience
<i>Geldokumentationssystem GelDoc 2000 System mit Software</i>	BioRad (München)
<i>Gelelektrophorese-Kammer Sub-Cell GT</i>	BioRad (München)

<i>GeneChip Fluidics Station 400</i>	Affymetrix (Santa Clara, USA)
<i>GeneChip Hybridization Oven</i>	Affymetrix (Santa Clara, USA)
<i>HG-Focus GeneChips</i>	Affymetrix (Santa Clara, USA)
<i>LightCycler-System mit LightCycler Software 3.5</i>	Roche (Mannheim)
<i>MicroArray Suite 5.0 Software</i>	Affymetrix (Santa Clara, USA)
Spektrometer <i>BioPhotometer</i>	Eppendorf (Hamburg)
Thermorührer <i>MR3302</i>	Heidolph (Schwabach)
Thermoschüttler <i>Thermomixer comfort</i>	Eppendorf (Hamburg)
Zellzählgerät <i>Micro Diff II.</i>	Beckman Coulter GmbH (Krefeld)
Zentrifuge <i>Biofuge fresco</i>	Heraeus (Osterode)
Zentrifuge <i>Megafuge 1.0R</i>	Heraeus (Osterode)
Zytometer <i>FACScan</i> und <i>Cellquest</i> Software	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg).

Zusätzliche Software-Programme wurden verwendet:

<i>affy</i> Paket der „R“ Software	http://www.bioconductor.org/
<i>ALFwin Sequence Analyser v2.10.06</i> Software	Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
<i>Excel</i> Software	Microsoft
<i>Irfan View</i> Software 3.7	Irfan Skiljan (Wien, Österreich)
<i>PRIMER3</i> Software	http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html
<i>SAM</i> Software v1.21 (<i>Significance Analysis of Microarrays</i>)	http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/
<i>IgBlast</i> Software	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/
<i>HLA Peptide Binding Prediction</i> Software (BIMAS)	http://bimas.dcrf.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform

2.2.2 Verbrauchsmaterialien

1,5 ml Reaktionsröhrchen	Eppendorf (Hamburg)
14 ml Röhrchen	Greiner Cellstar (Frickenhausen)
2 ml Reaktionsröhrchen	Eppendorf (Hamburg)
50 ml Röhrchen	BD Falcon (Franklin Lakes, USA)
96-Well-Nylonmembran-Kassetten	PerkinElmer (Shelton, CT, USA)
96-Well-Platten mit Rundboden	Corning (NY, USA)
96-Well-Platten mit transparenter Klebefolie für das ABI PRISM-System	Applied Biosystems (Darmstadt)
Bakterien-Kulturschalen	Greiner Cellstar (Frickenhausen)

FACS-Röhrchen	BD Falcon (Franklin Lakes, USA)
Küvetten 1 cm	Eppendorf (Hamburg)
<i>LightCycler</i> -Kapillaren	Roche (Mannheim)
PCR-Röhrchen 0,2 ml und 0,5 ml	Biozym (Oldendorf)
<i>Transwell</i> -Membranen, Durchmesser 6,5 mm für 24-Well-Platten, Porengröße 8 µm	Costar (Cambridge, MA, USA)
Zellkulturflaschen 175 cm ²	BD Falcon (UK)

2.2.3 Chemikalien und Enzyme

β-Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
β-Szintillationsflüssigkeit (<i>Beta Plate Scint</i>)	Wallac (Turku, Finnland)
Agarose (Agar-Agar technisch)	Merck (Darmstadt)
Ampicillin	Sigma (Steinheim)
<i>AmpliTaq</i> -Polymerase und PCR-Puffer	Applied Biosystems (Darmstadt)
<i>BD calibration beads</i>	BD Biosciences (San Jose, USA)
<i>Blue White Select Screening Solution</i>	Sigma (Steinheim)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
Brefeldin A	Sigma (Steinheim)
Carboxyfluorescein-Diazetat-Succinimidylester (CFDA-SE)	Molecular probes (Paisley, UK)
<i>Cytofix</i> / <i>Cytoperm</i> -Lösung	BD Biosciences (San Jose, USA)
DMSO, 20 % <i>Cryosure-DMSO</i>	Wak-Chemie Medical (Steinbach)
<i>DNA-Ladder</i> 100 bp	Promega (Madison, WI, USA)
dNTPs	Amersham Biosciences (Braunschweig)
dNTPs	Applied Biosystems (Darmstadt)
DTT	Invitrogen (Karlsruhe)
EDTA	Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid-Lösung, 1 %ig	Sigma (Steinheim)
<i>FACS-Flow</i>	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Fibronektin	Sigma (Steinheim)
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA (Pasching, Österreich) Biochrom AG (Berlin)
Formalin-Lösung, 37 %ig	Merck (Darmstadt)
Gelelektrophoresepuffer <i>Blue / Orange Loading dye</i>	Promega (Madison, WI, USA)
Giemsa-Lösung	Merck (Darmstadt)
Glutamin-Lösung, 200 mM	Sigma (Steinheim)
GM-CSF <i>Leukine</i>	Immunex (Seattle, USA)

HCl 0,1 N	Merck (Darmstadt)
Hefeextrakt	Beckton Dickinson (Le Pont de Claix, Frankreich)
Hepes	Biochrom AG (Berlin)
IFN- α 2b <i>IntronA</i>	Griffith Micro Science (Rantigny, Frankreich)
Ionomyzin	Sigma (Steinheim)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Isotone Kochsalzlösung (0,9% NaCl)	Braun (Melsungen)
<i>Lymphoprep</i>	Axis-Shield (Oslo, Norwegen)
May-Grünwald-Lösung	Merck (Darmstadt)
MgCl ₂	Applied Biosystems (Darmstadt)
MS2 Phagen-RNA	Roche (Mannheim)
MuLV reverse Transkriptase und PCR-Puffer II	Applied Biosystems (Darmstadt)
N6 <i>random</i> Primer	Invitrogen (Karlsruhe)
NaCl	Merck (Darmstadt)
NaOH	Merck (Darmstadt)
Oligo (dT) ₁₆ -Primer	Applied Biosystems (Darmstadt)
Penicilin / Streptomycin-Lösung	Sigma (Steinheim) Gibco (Paisley, UK)
<i>Perm- / Wash</i> -Lösung	BD Biosciences (San Jose, USA)
Phorbolmyristatazetat (PMA)	Sigma (Steinheim)
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom AG (Berlin)
Propidiumiodid (PI)	Becton Dickinson (San Jose, USA)
rekombinanter TNF- α	Sigma (Steinheim)
rekombinantes CCL19 (Mip-3 β)	Promocell (Heidelberg)
rekombinantes IL-2	Chiron
rekombinantes IL-4	Promocell (Heidelberg)
Restriktionsenzym EcoRI und Reaktionspuffer	BioLabs (New England, USA)
Restriktionsenzym PstI und Reaktionspuffer	BioLabs (New England, USA)
reverse Transkriptase M-MLV und Reaktionspuffer	Invitrogen (Karlsruhe)
Rinderserumalbumin (BSA)	Merck (Darmstadt)
RLT-Puffer	Qiagen (Hilden)
RNase-freies Wasser	Qiagen (Hilden)
Rnase-Inhibitor	Applied Biosystems (Darmstadt)
RNasin / RNase-Inhibitor	Promega (Mannheim)
<i>RosetteSep</i> Antikörper-Gemisch <i>Human Monocyte Enrichment Cocktail</i>	Stem Cell Technologies Inc. (Vancouver, Kanada)
RPMI 1640 Medium mit Phenolrot	Biochrom AG (Berlin)
RPMI 1640 Medium ohne Phenolrot	Gibco (Paisley, UK)
Humanes Serumalbumin <i>Humanalbin</i> 20 %	Aventis Behring GmbH (Marburg)
TRIS	Merck (Darmstadt)

Tritium-markiertes Thymidin (³ [H]-Thymidin) 1 mCi / ml	Amersham Biosciences (Braunschweig)
Trypanblau-Lösung, 0,5 %ig	Biochrom AG (Berlin)
Trypton	Beckton Dickinson (Le Pont de Claix, Frankreich)
X-VIVO 20 Medium	BioWhitaker Europe (Verviers, Belgien)

2.2.4 Kits

<i>MACS NK cell separation Kit</i>	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
<i>Assays-on-Demand Gene Expression Products</i>	Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH (Darmstadt)
<i>Enzo Bioarray HighYield RNA Transcript Labeling Kit</i>	Affymetrix (Santa Clara, USA)
<i>GeneChip Sample Cleanup Modul für Affymetrix</i>	Qiagen (Hilden)
<i>LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes Kit</i>	Roche (Mannheim)
<i>QIAamp DNA Blood Mini Kit</i>	Qiagen (Hilden)
<i>QIAprep Miniprep Kit zur Isolierung von Plasmid-DNA</i>	Qiagen (Hilden)
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen (Hilden)
<i>RNA 6000 Pico LabChip Kit</i>	Caliper Technologies
<i>RNeasy Mini Kit</i>	Qiagen (Hilden)
<i>Superscript Double-Stranded cDNA Synthesis Kit</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>Taqman β-Actin Control Reagents Kit</i>	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
<i>TaqMan Universal PCR Master Mixes</i>	Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH (Darmstadt)
<i>TOPO TA Cloning Kit</i>	Invitrogen (Karlsruhe)

2.2.5 Monoklonale Antikörper

Antigen	Konjugat	Klon	Quelle	Spezifität	Anwendung	Firma
CD1a	PE	HI149	Maus	Mensch	FACS	BD Biosciences (San Jose, USA)
CD3	PE	SK7	Maus	Mensch	FACS	BD Biosciences (San Jose, USA)
CD3	FITC	SK7	Maus	Mensch	FACS	BD Biosciences (San Jose, USA)
CD4	PerCP	SK3	Maus	Mensch	FACS	BD Biosciences (San Jose, USA)
CD7	PE	M-T701	Maus	Mensch	FACS	BD Biosciences (San Jose, USA)
CD8	PerCP	SK1	Maus	Mensch	FACS	BD Biosciences (San Jose, USA)
CD11c	PE	S-HCL-3	Maus	Mensch	FACS	BD Biosciences (San Jose, USA)

CD14	PE	MΦP9	Maus	Mensch	FACS	BD Biosciences (San Jose, USA)
CD16	PE	3G8	Maus	Mensch	FACS, IC FACS	BD Biosciences (San Jose, USA)
CD19	PE	4G7	Maus	Mensch	FACS	BD Biosciences (San Jose, USA)
CD23	PE	EBVCS-5	Maus	Mensch	FACS	BD Biosciences (San Jose, USA)
CD38	PE	HB7	Maus	Mensch	FACS	BD Biosciences (San Jose, USA)
CD40	PE	5C3	Maus	Mensch	FACS, IC FACS	BD Biosciences (San Jose, USA)
CD45	FITC	HI30	Maus	Mensch	FACS	BD Biosciences (San Jose, USA)
CD49b	FITC	AK-7	Maus	Mensch	FACS	BD Biosciences (San Jose, USA)
CD54	PE	LB-2	Maus	Mensch	FACS	BD Biosciences (San Jose, USA)
CD56	PE	MY31	Maus	Mensch	FACS	BD Biosciences (San Jose, USA)
CD64	FITC	22	Maus	Mensch	FACS	Beckman Coulter (Marseille, Frankreich)
CD80	PE	L307.4	Maus	Mensch	FACS, IC FACS	BD Biosciences (San Jose, USA)
CD83	PE	HB15e	Maus	Mensch	FACS, IC FACS	BD Biosciences (San Jose, USA)
CD86	PE	IT2.2	Maus	Mensch	FACS, IC FACS	BD Biosciences (San Jose, USA)
CD123	PE	9F5	Maus	Mensch	FACS	BD Biosciences (San Jose, USA)
CD209	PE	AZND1	Maus	Mensch	FACS	Beckman Coulter (Marseille, Frankreich)
HLA-DR	PE	L243	Maus	Mensch	FACS, IC FACS	BD Biosciences (San Jose, USA)
NKp44	PE	Z231	Maus	Mensch	FACS	Beckman Coulter (Marseille, Frankreich)
NKp46	PE	9E2/NKP46	Maus	Mensch	FACS	BD Biosciences (San Jose, USA)
NKG2D	PE	1D11	Maus	Mensch	FACS	BD Biosciences (San Jose, USA)
TRAIL	PE	RIK-2	Maus	Mensch	FACS, IC FACS	BD Biosciences (San Jose, USA)
GZMB	PE	HC4	Maus	Mensch	IC FACS	Hölzel Diagnostika (Köln)
IFN- γ	PE	4S.B3	Maus	Mensch	IC FACS	BD Biosciences (San Jose, USA)
IL-4	PE	8D4-8	Maus	Mensch	IC FACS	BD Biosciences (San Jose, USA)
CD28	ohne	CD28.2	Maus	Mensch	Kostimulation	BD Biosciences (San Jose, USA)

CD49d	ohne	9F10	Maus	Mensch	Kostimulation	BD Biosciences (San Jose, USA)
IgG1 / IgG2a Isotyp-Kontrolle	FITC / PE	X40/X39	Maus	Mensch	FACS	BD Biosciences (San Jose, USA)
IgG1 Isotyp-Kontrolle	PE	MOPC-21	Maus	Mensch	FACS, IC FACS	BD Biosciences (San Jose, USA)
IgG1 Isotyp-Kontrolle	FITC	MOPC-21	Maus	Mensch	FACS	BD Biosciences (San Jose, USA)
IgG2a Isotyp-Kontrolle	PE	G155-178	Maus	Mensch	FACS, IC FACS,	BD Biosciences (San Jose, USA)

Abkürzungen: FACS, *fluorescence activated cell sorting*; FITC, Fluoreszeinthiocyanat; IC intrazellulär; PE, Phycoerythrin; PerCP, Peridinin Chlorophyll a Protein.

2.2.6 Synthetische Oligonukleotide

Primer	Nukleotidsequenz	Anwendung	Firma	Referenz
Oligo-dT- T7-Promoter	5'-GGC CAG TGA ATT GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGG CGG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT-3'	cDNA-Synthese für <i>Microarray</i> -Analyse	Metabion (Martinsried)	
FR1c	5'-AGG TGC AGC TGS WGS AGT CDG G-3'	Vorwärts-Primer für Konsensus IgH PCR	Thermo Hybaid (Ulm)	Aubin <i>et al.</i> 1995 [112]
J _H 1245	5'-ACC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT-3'	Rückwärts-Primer für Konsensus IgH PCR	Thermo Hybaid (Ulm)	Aubin <i>et al.</i> 1995 [112]
J _H 3	5'-TAC CTG AAG AGA CGG TGA CCA TTG T-3'	Rückwärts-Primer für Konsensus IgH PCR	Thermo Hybaid (Ulm)	Aubin <i>et al.</i> 1995 [112]
J _H 6	5'-ACC TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT-3'	Rückwärts-Primer für Konsensus IgH PCR	Thermo Hybaid (Ulm)	Aubin <i>et al.</i> 1995 [112]
M13 Vorwärts- Primer	5'-GTAAACGACGGCCAG-3'	Sequenzierung	Invitrogen (Karlsruhe)	

Abkürzungen: A = Adenin; G = Guanin; T = Thymin; C = Cytosin; D = G, A oder T; S = G oder C; W = A oder T nach dem IUB Code.

2.2.7 Verwendete Puffer und Lösungen

MACS-Puffer:

PBS

0,5 % humanes Serumalbumin

2 mM EDTA

IFN-Medium:

X-VIVO 20 Medium

1000 U / ml IFN- α

1000 U / ml GM-CSF

IL-4-Medium:

X-VIVO 20 Medium

500 U / ml IL-4

800 U / ml GM-CSF

TNF-Medium:

X-VIVO 20 Medium

1000 U / ml TNF- α

800 U / ml GM-CSF

Einfriermedium:

RPMI 1640 Medium ohne Phenolrot

2 % (v / v) Humanalbumin

20 % *Cryosure*-DMSO

T-Zell-Medium:

RPMI 1640 Medium mit Phenolrot

10 % FCS

2 mM Glutamin

100 U / ml Penicilin / 100 μ g / ml Streptomycin

NK-Zell-Medium:

RPMI 1640 Medium

10 % FCS

1 % Penicilin / Streptomycin-Lösung

5 % Humanalbin

1000 U / ml IL-2

K562-Medium:

RPMI 1640 Medium

10 % FCS

1xTBE-Puffer:

H₂O

89 mM Tris

89 mM Borsäure

2 mM EDTA

2.3 Methoden

2.3.1 Herstellung und Analyse von Zellpräparationen

Alle Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt und bei 37 °C und 5 % CO₂ Atmosphäre in einem Brutschrank inkubiert. Waschschritte wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit PBS durchgeführt.

2.3.1.1 Gewinnung mononukleärer Zellen

Zur Gewinnung von MNCs wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Hierzu wurden 10 bis 25 ml peripheres Blut vorsichtig auf ein gleiches Volumen in 50 ml Röhrchen vorgelegtes *Lymphoprep* geschichtet. Nach 30 min. Zentrifugation bei 1.200 g und Raumtemperatur wurden die angereicherten MNCs vorsichtig mit einer Pipette aus der entstandenen Interphase zwischen Plasma und *Lymphoprep* entnommen. Nach zweimaligem Waschen mit PBS und 10 min. Zentrifugation bei 1.200 g wurden die sedimentierten Zellen in kleinen Volumina Medium je nach Verwendung resuspendiert.

2.3.1.2 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Zellzahlen wurden mit Hilfe eines automatischen Zellzählgerätes ermittelt. Die Ergebnisse für die Leukozytenkonzentrationen von Zellsuspensionen in Medien oder Puffern entsprechen stichprobenartig den Werten, die durch Zählung in einer Neubauerkammer bestimmt wurden.

Für die Bestimmung der Vitalität wurden die Zellsuspensionen mit äquivalentem Volumen einer 0,5 %igen (w / v) Trypanblau-Lösung verdünnt. Dieser Farbstoff dringt in tote Zellen mit Membranschädigungen ein, während vitale Zellen ungefärbt bleiben. Die Viabilität der Zellen wurde durch lichtmikroskopische Auszählung blaugefärbter und ungefärbter Zellen mit einer Neubauerkammer nach folgendem Schema ermittelt: Viabilität = ungefärbte Zellen je Flächeneinheit / (gefärbte + ungefärbte Zellen je Flächeneinheit).

2.3.1.3 Anreicherung von Monozyten durch Negativselektion

Zur Anreicherung von Monozyten durch Negativselektion wurde peripheres Blut vor der Dichtegradientenzentrifugation zunächst 20 min. mit 50 µl je ml Blut eines *RosetteSep* Antikörper-Gemisches nach Angaben des Herstellers inkubiert. Dieses Antikörper-Gemisch depletiert CD2+, CD3+, CD8+, CD19+, CD56+ und CD66b+ Zellen durch Quervernetzung der Zellen mit den Erythrozyten. Anschließend wurde die Blutprobe mit dem 1,5-fachen Volumen *MACS*-Puffer versetzt und eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Hierbei sedimentierten die mit den Erythrozyten quervernetzten Leukozyten. Die angereicherten Monozyten wurden durch Abnahme der Interphase gewonnen und zweimal mit PBS gewaschen. Zur Generierung von DCs wurden die Monozyten im entsprechenden Medium resuspendiert und auf eine Zelldichte von etwa $2-4 \times 10^6$ Zellen / ml verdünnt. Schließlich wurden etwa $1-2 \times 10^8$ Zellen in 50 ml Medium in je eine 175 cm² Plastikkulturflasche gegeben.

2.3.1.4 Anreicherung von Monozyten durch das Adhärenz-Verfahren

Beim Adhärenz-Verfahren wurden die durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen MNCs in serumfreies X-VIVO 20 Medium ohne weitere Zugaben aufgenommen und auf eine Dichte von ca. 4×10^6 Zellen / ml verdünnt. Etwa 2×10^8 Zellen in 50 ml wurden in je eine 175 cm² Kulturflasche überführt und 1-2 h inkubiert. In dieser Zeit adhären Monozyten auf der Plastikoberfläche. Andere Zellen wurden dann mit dem Überstand verworfen. Der Zellrasen in der Kulturflasche wurde vor der Zugabe von 50 ml des entsprechenden Mediums zur Herstellung von DCs dreimal mit PBS gewaschen.

2.3.1.5 Kultivierung von dendritischen Zellen

IFN-DCs wurden durch dreitägige Inkubation der Monozyten mit serumfreiem IFN-Medium generiert. Für die Herstellung von IL-4 / TNF-DCs wurden die Monozyten zunächst für 5 Tage in serumfreiem IL-4-Medium inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium zur Reifung der DCs gewechselt. Hierzu wurde die Zellsuspension aus der Flasche entnommen und 10 min. bei 1.200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und durch TNF-Medium ersetzt. Die sedimentierten Zellen wurden resuspendiert und für zwei weitere Tage in derselben Kulturflasche inkubiert.

DCs verlieren ihre Adhäsivität auf Plastikoberflächen. Sie wurden nach der Kulturperiode mit dem Überstand aus der Kulturflasche entnommen. Der Zellrasen wurde dreimal unter kräftigem Schütteln mit PBS nachgewaschen und die Überstände gesammelt. Die Zellen wurden herunterzentrifugiert, in einem Röhrchen vereinigt und erneut mit PBS gewaschen. Schließlich wurden sie in wenigen Millilitern serumfreiem X-VIVO 20 Medium ohne Zusätze zur Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung bzw. zur Verwendung für weitere Experimente resuspendiert.

2.3.1.6 Kryokonservierung und Auftauen von Zellpräparationen

Für spätere Analysen wurden die Zellen kryokonserviert. Hierzu wurden die Zellsuspensionen mit einem äquivalenten Volumen Einfriermedium versetzt. Die Präparationen wurden in Aliquots à 5×10^6 oder 1×10^7 Zellen in 1,8 ml Kryoröhrchen abgefüllt. Zur langsamen Herunterkühlung wurden die Röhrchen in einer *Cryobox* in einen -80 °C Gefrierschrank gestellt. Hierdurch wurde eine annähernd lineare Temperatursenkung von etwa 1 °C / min. gewährleistet.

Zum Auftauen wurden die Aliquots schnell bei Handwärme aufgetaut und die Zellsuspension in kaltes vorgelegtes PBS überführt. Die Zellen wurden herunterzentrifugiert, in PBS gewaschen und je nach Anwendung in 1 ml Medium oder PBS resuspendiert und auf die entsprechenden Zellzahlen verdünnt.

2.3.1.7 Färbung von Zellpräparaten und Mikroskopie

In PBS resuspendierte Zellen wurden zur mikroskopischen Untersuchung in einem Tropfen auf einen unbeschichteten Objektträger pipettiert und zur Trocknung stengelassen. Mit den getrockneten Präparaten wurde eine panoptische Färbung nach Pappenheim durchgeführt, einer optimierten Kombinationsfärbetechnik, die routinemäßig zur Färbung von Blut- und

Knochenmarkausstrichen angewandt wird. Die Färbeprozedur wurde automatisch mit Hilfe eines Färbe-Automaten durchgeführt. Einzelzellen wurden lichtmikroskopisch bei 630-facher Vergrößerung betrachtet, mit einer Farbvideokamera fotografiert und mit Hilfe der *Irfan View* Software digitalisiert.

2.3.1.8 Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung des Anteils residueller Lymphozyten und Monozyten in der Gesamtzellpopulation wurden die Zellen mit folgenden Antikörpern markiert:

CD45-FITC (Leukozyten), CD3-PE (T-Zellen), CD14-PE (Monozyten), CD19-PE (B-Zellen) und CD56-PE (NK-Zellen).

Zur Analyse der Monozyten- und DC-Populationen wurden die Zellen mit folgenden Antikörpern markiert: CD45-FITC, CD14-PE, CD1a-PE, CD11c-PE, CD23-PE, CD38-PE, CD40-PE, CD54-PE, CD64-FITC, CD80-PE, CD83-PE, CD86-PE, CD123-PE, CD209-PE und HLA-DR-PE.

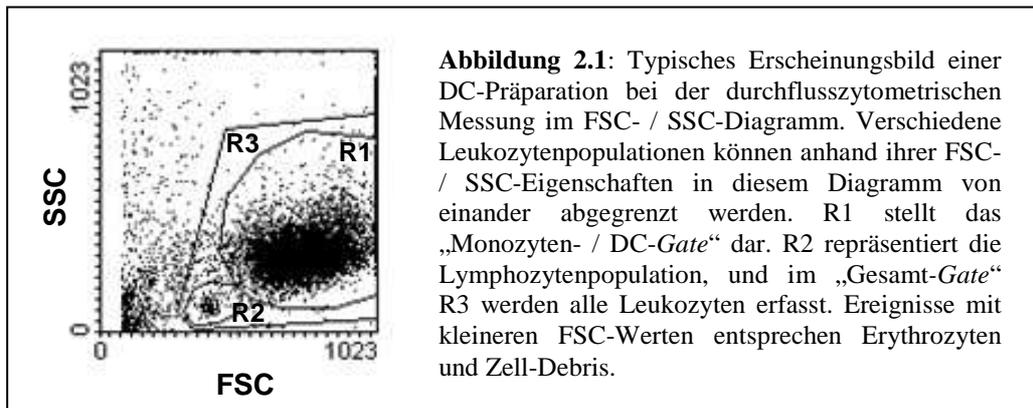
Zur Analyse von NK-Zell-Markern wurden folgende Antikörper verwendet: CD49b-FITC, CD56-PE, NKp44-PE, NKp46-PE, NKG2D-PE und TRAIL-PE.

Für die immunphänotypische Analyse der Zellen wurden je 10 µl der FITC- oder PE-konjugierten, monoklonalen Antikörper in beschriftete FACS-Röhrchen vorgelegt. Etwa 100 µl Zellsuspension mit ca. 1×10^5 Zellen wurden dazugegeben und 30 min. bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Hiernach wurden die Zellen mit PBS gewaschen, 5 min. bei 1.200 g abzentrifugiert und in etwa 250 µl einer 0,5 %igen Formalin-Lösung in *FACS-Flow* fixiert.

In einigen Experimenten wurden die Zellmembranen für eine intrazelluläre Detektion der Proteine vor der Antikörper-Markierung permeabilisiert. Hierzu wurden 5×10^6 Zellen vorsichtig in 6 ml der Saponin-haltigen *Cytofix / Cytoperm*-Lösung resuspendiert und 20 min. bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit etwa 4 ml einer ebenfalls Saponin-haltigen *Perm- / Wash*-Lösung gewaschen und in 1-3 ml *Perm- / Wash*-Lösung resuspendiert. Je 100 µl der Zellsuspension wurden zu je 20 µl der vorgelegten Antikörper für die intrazytoplasmatische Markierung pipettiert und 30 bis 45 min. bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Schließlich wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 250 µl 0,5 %iger Formalin-Lösung fixiert.

Die durchflusszytometrische Messung wurde mit einem *FACScan* Zytometer unter Verwendung der *Cellquest* Software durchgeführt. Verschiedene Leukozytenpopulationen wurden mit Hilfe eines FSC- / SSC-Diagramms (Vorwärts- und Seitwärts-Streulicht) voneinander abgegrenzt. **Abbildung 2.1** zeigt die verschiedenen Regionen für die

Eingrenzungen von Monozyten oder DCs („Monozyten-Gate“ oder „DC-Gate“, R1), Lymphozyten („Lymphozyten-Gate“, R2) und allen Zellen („Gesamt-Gate“, R3). Ereignisse mit geringen FSC-Werten entsprechen Zelldebris und Erythrozyten und wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Die Fluoreszenzeigenschaften der verschiedenen Regionen wurden separat ausgewertet.



Die Geräteeinstellungen wurden so gewählt, dass 99–100 % der Ereignisse von Kontrollansätzen, die mit unspezifischen Isotyp-Antikörpern markiert wurden, im linken unteren Quadranten des Diagramms lagen. Für die separate Messung von Monozyten und DCs (R1), die eine stärkere Eigenfluoreszenz als Lymphozyten zeigen, wurden die Fluoreszenzverstärker entsprechend herunterreguliert.

Für jede Messung wurden jeweils 5.000 Ereignisse mit den entsprechenden FSC- / SSC-Eigenschaften akquiriert. Ereignisse mit größeren Fluoreszenzwerten als in der Isotyp-Kontrolle wurden positiv gewertet. Die Ergebnisse wurden als das Verhältnis der positiv markierten CD45+ Zellen zu allen CD45+ Zellen des Gates in Prozent oder als mittlere Fluoreszenzintensitäten (MFI) ausgedrückt. Graphisch wurden die Ergebnisse als zweidimensionale Diagramme oder Histogramme dargestellt.

2.3.1.9 Allogene gemischte Leukozyten-Reaktion (MLR)

Zur Funktionstestung der DCs wurden frisch gewonnene allogene MNCs aus dem peripheren Blut immer desselben gesunden Spenders (Responderzellen) in T-Zell-Medium resuspendiert und auf eine Dichte von 2×10^6 Zellen / ml verdünnt. Diese wurden bis zur Verwendung in einem 14 ml Röhrchen mit losem Deckel bei 37 °C inkubiert. Parallel wurde je ein Aliquot kryokonservierter DCs als Stimulatorzellen aufgetaut. Diese wurden mit PBS gewaschen, in T-Zell-Medium resuspendiert und auf eine Dichte von 1×10^6 Zellen / ml verdünnt. Zur

Vermeidung einer potenziellen Hintergrund-Proliferation der Stimulatorzellen wurden diese mit einer γ -Strahlung von 30 Gy behandelt. Hierzu wurden die DC- und Monozyten-Präparationen in je einem 14 ml Röhrchen auf Eis in das Institut für Umwelthygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf transportiert und dort von einem Mitarbeiter der Abteilung für Immunologie im Nuklearbereich des Instituts über 5 min. mit einer Caesium-Quelle bestrahlt, was 30 Gy entspricht. Im Anschluss wurde eine Verdünnungsreihe der bestrahlten Stimulatorzellen hergestellt. Die Stimulatorzellen wurden dann in unterschiedlichen Zellzahlen à 5×10^4 , 2×10^4 und 5×10^3 in jeweils 100 μ l in je ein Loch (*Well*) einer beschrifteten 96-*Well*-Platte mit Rundboden vorgelegt. Danach wurden je 1×10^5 Responderzellen dazupipettiert. Zur Verstärkung spezifischer Proliferationsantworten der Responderzellen wurden die kostimulatorischen Antikörper gegen CD28 und CD49d mit einer Endkonzentration von je 1 μ g / ml dazugegeben. Als Negativ-Kontrollen wurden das Medium alleine, Responderzellen ohne Zugabe von Stimulatorzellen sowie Stimulatorzellen alleine angesetzt. Als Positiv-Kontrolle wurden Responderzellen mit 1 μ g / ml Ionomycin und 10 ng / ml Phorbolmyristatazetat (PMA) inkubiert. Alle Kulturen wurden in einem Gesamtvolumen von 200 μ l im Triplikat angesetzt. Die befüllte 96-*Well*-Platte wurde 4 Tage bei 37 °C inkubiert. Nach drei Tagen wurden für die letzten 18-20 h der Kulturdauer in jedes befüllte *Well* 10 μ l à 1 μ Ci einer frisch angesetzten Lösung von 3 [H]-Thymidin in T-Zell-Medium dazupipettiert. Das Wasserstoff-Isotop Tritium, 3 [H], ist ein β -Strahler mit einer geringen Reichweite von 6 mm und einer Halbwertszeit von 12,3 Jahren.

Nach der Kultivierung wurden die Zellen mit einem an eine Druckpumpe angeschlossenen *Filtermate-Harvester* auf eine 96-*Well*-Nylonmembran-Kassette überführt. Nicht inkorporierte radioaktiv markierte Nukleotide wurden durch mehrmaliges Waschen der Membran mit destilliertem Wasser mit Hilfe des *Harvesters* abgespült. Die Membran wurde mindestens einen Tag zur Trocknung stehen gelassen. Anschließend wurden in jedes *Well* der Nylonmembran-Kassette 25 μ l einer β -Szintillationsflüssigkeit pipettiert. Die Messung der Radioaktivität des inkorporierten Tritium-markierten Thymidins wurde mit einem β -Szintillations-*Counter* durchgeführt. Die gemessenen *Counts* pro Minute (cpm) sind proportional zur Menge der inkorporierten markierten Nukleotide.

Mit Hilfe eines an den *Counter* angeschlossenen Computers wurden die cpm-Werte unter Verwendung der mitgelieferten Software in ein *Excel*-Dokument überführt und ausgewertet. Aus den cpm-Werten der Triplikate wurden Durchschnittswerte ermittelt. Stimulations-Indizes (SI) wurden nach folgender Formel berechnet: $SI = \text{cpm stimulierter MNCs} / \text{cpm unstimulierter MNCs}$.

2.3.1.10 Intrazelluläre durchflusszytometrische Zytokindetektion

Wie bei der MLR wurden allogene Responderzellen eines gesunden Spenders verwendet sowie aufgetaute Aliquots kryokonservierter DCs und Monozyten. 1×10^5 Responderzellen wurden mit je 5×10^4 Stimulatorzellen in einem Gesamtvolumen von 200 μ l T-Zell-Medium ohne weitere Zugaben in je einem *Well* einer 96-*Well*-Platte mit Rundboden zusammengegeben. Je Stimulatorzell-Präparation wurden so mindestens 10 *Wells* befüllt. Als Negativ-Kontrolle wurden Responderzellen ohne Zugabe von Stimulatorzellen angesetzt. Wie für die MLR wurden als Positiv-Kontrolle Responderzellen mit 1 μ g / ml Ionomycin und 10 ng / ml PMA inkubiert. Die befüllte 96-*Well*-Platte wurde drei Tage bei 37 °C inkubiert. Für die letzten 4 h der Kulturdauer wurden in jedes *Well* 10 μ g / ml Brefeldin A zugesetzt. Diese chemische Substanz blockiert die Funktion des Golgi-Apparates und somit die Sekretionsmaschinerie der Zelle. Hierdurch akkumulieren die normalerweise sezernierten Zytokine in der Zelle und können durch intrazytoplasmatische Durchflusszytometrie detektiert werden.

Nach der Kultur wurden die Zellsuspensionen jeweils gleicher Ansätze in einem 14 ml Röhrchen vereinigt. Die *Wells* wurden mit PBS nachgespült. Hiernach wurden die geernteten Zellen 10 min. bei 1.200 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf etwa 500 μ l abpipettiert und verworfen. Die Zellen wurden im Restüberstand resuspendiert.

Für die Markierung der Zellen wurden ein FITC-konjugierter Antikörper gegen CD3, ein PE-konjugierter unspezifischer Antikörper und PE-konjugierte Antikörper gegen die Zytokine IFN- γ bzw. IL-4 sowie PerCP-konjugierte Antikörper gegen CD4 und CD8 verwendet. Zunächst wurden nur die Antikörper gegen Zelloberflächenmoleküle (je ein FITC- und ein PerCP-konjugierter Antikörper) à jeweils 10 μ l in die beschrifteten FACS-Röhrchen vorgelegt. Die PE-konjugierten Antikörper sollten intrazellulär binden und wurden daher erst nach dem Permeabilisierungsschritt eingesetzt. Je FACS-Röhrchen wurden nach Vorgabe jeweils etwa 100 μ l der gesammelten Zellsuspensionen zugegeben und 30 min. bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und abzentrifugiert. Zur Permeabilisierung und Fixierung der Zellmembran wurden die Zellen vorsichtig in 250 μ l der *Cytofix* / *Cytoperm*-Lösung resuspendiert und 20 min. bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Hiernach wurden die Zellen zweimal mit 2 ml *Perm*- / *Wash*-Lösung gewaschen. Nach Zugabe von 20 μ l des PE-konjugierten Antikörpers gegen IL-4 oder IFN- γ bzw. des Kontrollantikörpers für die intrazytoplasmatische Markierung wurden die Zellen in der Restflüssigkeit resuspendiert und 30 bis 45 min. bei 4 °C im Dunkeln inkubiert, anschließend gewaschen und fixiert. Die durchflusszytometrische Messung wurde wie für die

immunphänotypische Analyse beschrieben durchgeführt. Bei jeder Messung wurden mindestens 10.000 CD3+ Ereignisse akquiriert. Für die Auswertung der spezifischen Detektion von IFN- γ und IL-4 wurden sowohl alle CD3+ T-Zellen insgesamt als auch die Subpopulationen von CD4+ und CD8+ T-Zellen betrachtet.

2.3.1.11 Migrationsassay

Migrationsexperimente wurden mit Hilfe von 6,5 mm Durchmesser großen *Transwell*-Membranen mit einer Porengröße von 8 μm für 24-*Well*-Platten durchgeführt. Die Membranen wurden zunächst mit 30 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ Fibronektin beschichtet. Hierzu wurden 3,3 μg Fibronektin in 300 μl PBS in jedes *Well* pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Lösung aspiriert und zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch 300 μl einer 1 %igen BSA-Lösung in PBS ersetzt und die Membranen 30 min. bei 37 °C inkubiert. Nach Abnahme der BSA-Lösung wurden die Membranen zweimal mit 300 μl einer 25 mM HEPES-Lösung gewaschen. Parallel wurden kryokonservierte DC-Aliquots aufgetaut und die Zellen in serumfreiem X-VIVO 20 Medium resuspendiert und auf eine Dichte von $1,66 \times 10^6 / \text{ml}$ verdünnt. In die obere Kammer des *Transwell*-Systems wurden $2,5 \times 10^5$ DCs in 150 μl Medium gefüllt. In die untere Kammer wurden 500 μl Medium mit oder ohne Zugabe von 100 ng / ml des rekombinanten Chemokins CCL19 gegeben. Die Ansätze wurden 2 h bei 37 °C inkubiert. Zur Bestimmung der Zahl migrierter Zellen wurde das komplette Medium aus der unteren Kammer sorgfältig abgenommen und in beschriftete FACS-Röhrchen überführt. Die absolute Zellzahlbestimmung wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie, wie für die immunphänotypische Analyse beschrieben, durchgeführt. Hierzu wurden vor der Messung nach Auszählung in einer Neubauerkammer 20.000 FITC-konjugierte Kunststoffkügelchen (*BD calibration beads*) in ca. 20 μl in jedes FACS-Röhrchen dazugegeben. Jede Messung wurde solange durchgeführt, bis 5.000 Kügelchen, die sich durch einen geringen FSC-Wert und hohe FITC-Fluoreszenzintensität auszeichnen, akquiriert waren, d.h. ein Viertel des Gesamtvolumens. Die absolute Zahl der migrierten DCs wurde dann durch folgende Formel errechnet:

Zahl migrierter Zellen = (Zahl der Ereignisse mit FSC- / SSC-Eigenschaften von DCs) x 4.

2.3.1.12 Zytotoxizitätsassay

Um das zytotoxische Potenzial von DCs gegenüber Tumorzellen zu testen, wurden Kokulturrexperimente von DCs mit der Zelllinie K562 durchgeführt und die Lyse der

Tumorzellen durchflusszytometrisch analysiert. Die K562-Zellen wurden in K562-Medium kultiviert. Zur Markierung wurden die K562-Zellen zunächst in PBS gewaschen, 1×10^5 Zellen in 1 ml PBS mit $0.5 \mu\text{M}$ Carboxyfluorescein-Diazetat-Succinimidylester (CFDA-SE) resuspendiert und 15 min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die mit CFDA-SE markierten Zellen in K562-Medium gewaschen und 1×10^6 / ml resuspendiert. Für die Kokultur wurden frisch präparierte DCs im gleichen Medium resuspendiert. Als Positiv-Kontrolle wurden IL-2-aktivierte NK-Zellen verwendet. Die NK-Zellen wurden mit dem *MACS NK cell separation Kit* nach Angaben des Herstellers aus dem Blut eines gesunden Spenders selektioniert und über 4-5 Wochen in IL-2-haltigem NK-Zell-Medium kultiviert. Die humane Lymphom-B-Zelllinie MHH-PREB-1 diente als Negativ-Kontrolle. Je Ansatz wurden 1×10^5 K562-Zellen mit unterschiedlichen Effektorzellzahlen 2×10^6 , 2×10^5 , 1×10^5 und 5×10^4 Zellen in einem Gesamtvolumen von 1 ml in FACS-Röhrchen über 4 h bei 37°C kokultiviert.

Nach der Kultur wurden die Zellen einmal in kaltem PBS gewaschen und zur Detektion lysierter Zellen mit $2 \mu\text{l}$ 1:100 verdünnter Propidiumiodid-Lösung versetzt. Schließlich wurden die Zellen wie oben beschrieben durchflusszytometrisch analysiert. Die spezifische Lyse durch die Effektorzellen wurde anhand des Anteils toter K562-Zellen entsprechend der folgenden Formel berechnet: % spezifische Lyse = Anteil der PI+ CFDA-SE-markierten Zellen nach Zugabe von Effektorzellen – Anteil der PI+ CFDA-SE-markierten Zellen ohne Effektorzellen.

2.3.1.13 Genexpressionsanalyse

2.3.1.13.1 Theoretischer Hintergrund

Zur Analyse der differenziellen Genexpression von IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs wurden mRNA-Präparationen mit Hilfe der *Microarray*-Technik analysiert. Dieses Verfahren ermöglicht es, parallel die Expression von mehreren Tausend Genen zu untersuchen. In dieser Studie kam das *GeneChip* Expressionsanalyse-Verfahren für eukaryotische RNA der Firma Affymetrix zur Anwendung. Zur Aufbereitung der RNA-Proben für die Hybridisierung auf den *Microarrays* wurden Protokolle und Geräte verwendet, die in Kooperation der Firmen Affymetrix, Invitrogen, Qiagen und Agilent Technologies entwickelt wurden.

Nach Extraktion der Gesamt-RNA aus Zelllysaten wird die Gesamt-mRNA mittels eines Oligo-dT-Primers mit einer 5'-angehängten T7-Promotersequenz über reverse Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben. Diese wird dann durch eine *in vitro* Transkriptionsreaktion in

Anwesenheit biotinylierter Ribonukleotide in eine *Antisense*-cRNA überführt, amplifiziert und zu kürzeren Stücken fragmentiert. Anschließend erfolgt die Hybridisierung dieser Biotin-markierten cRNA-Fragmente auf dem *Microarray*. Hier sind durch ein kombiniertes Verfahren aus Fotolithografie und kombinatorischer Chemie auf einer beschichteten Quartz-Oberfläche von etwa 2 cm² Oligonukleotide mit cDNA-Sequenzen von etwa 25 Nukleotiden Länge aufgebracht. Diese Nukleotidlänge ermöglicht eine sehr spezifische Hybridisierung der RNA-Moleküle. Unterschiedliche Oligonukleotide sind jeweils in millionenfacher Kopienzahl in definierten Abschnitten (*tiles*) des *Microarrays* vorhanden. Nach Inkubation mit Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE) und einem biotinylierten Anti-Streptavidin-Antikörper zur Verstärkung des Signals kann die Fluoreszenz der spezifisch an die Oligonukleotide gebundenen biotinylierten cRNA-Moleküle mit einem hochauflösenden Scanner detektiert werden. Die Daten werden mit einem angeschlossenen Computer und spezieller Software analysiert.

Um eine möglichst hohe Sensitivität zu erreichen, wird jedes Gen durch einen Satz verschiedener Oligonukleotide (*probe set*) repräsentiert. Die Fluoreszenzintensität für ein Gen wird über die Signale der hybridisierten RNA-Fragmente eines *probe sets* gemittelt. Um die Daten der einzelnen *Microarrays* miteinander vergleichen zu können, werden die ermittelten Gesamtfluoreszenzintensitäten der *Microarrays* normalisiert. Anhand mathematischer Algorithmen kann aus den normalisierten Daten ein Profil der differenziell exprimierten Gene erstellt werden.

2.3.1.13.2 RNA-Extraktion aus Zellpräparationen

Die Gesamt-RNA aus je 5 IFN-DC- und 5 IL-4 / TNF-DC-Präparationen wurde mit Hilfe des *RNeasy Mini Kits* für RNA-Mengen bis 100 µg nach Angaben des Herstellers extrahiert. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Hierfür wurden zunächst jeweils 1×10^7 Zellen durch zweiminütige Zentrifugation bei maximaler Umdrehungszahl sedimentiert. Das Pellet wurde anschließend in 600 µl Guanidin-Isothiozyanat (GITC) -haltigem RLT-Puffer mit 1 % β-Mercaptoethanol resuspendiert und bis zur Präparation der RNA bei -20 °C gelagert. GITC und β-Mercaptoethanol denaturieren kontaminierende RNasen.

Zur Homogenisierung wurden die eingefrorenen Zelllysate aufgetaut und direkt auf eine *QIAshredder*-Säule in einem 2 ml Sammelröhrchen gegeben und 2 min. bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert. Hierbei werden hochpolymere, molekulare Strukturen wie DNA in einem speziellen Biopolymer der Säule durch Scherkräfte fragmentiert. Der

homogenisierte Durchfluss wurde mit 600 µl Ethanol versetzt und gemischt. Das Gemisch wurde auf eine *Spin*-Säule gegeben und zur Adsorption der RNA an die Silikon-Gel-Membran der Säule 15 sec. zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die adsorbierte RNA wurde durch Zugabe von 700 µl *RWI*-Puffer und Zentrifugation für 15 sec. und anschließender Zugabe von 500 µl *RPE*-Puffer und zweiminütiger Zentrifugation gewaschen. Die RNA wurde durch Zugabe von 50 µl RNase-freiem Wasser und einminütiger Zentrifugation in ein 1,5 ml Reaktionsröhrchen eluiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt oder bei –20 °C eingefroren.

Die Konzentration der RNA wurde in einem Spektrometer durch Bestimmung der Extinktion E_{260} der Lösung in einer 1 cm Küvette bei einer Wellenlänge von 260 nm mit einer spezifischen Extinktion für RNA von (40 ng / µl) / [E] ermittelt. Die Qualität der RNA-Präparation wurde extern bestimmt (vgl. Abschnitt 2.3.1.13.7).

2.3.1.13.3 cDNA-Synthese

Für den RT-Reaktionsansatz in einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden zunächst 5 µg der Gesamt-RNA und 100 pmol eines Oligo-dT-Primers mit einem 39 Nukleotide langen 5'-Anhang eines T7-RNA-Polymerase-Promoters in 12 µl RNase-freiem Wasser gemischt und zur Denaturierung 10 min. bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurde die denaturierte RNA auf Eis abgekühlt. Die RT-Reaktion und die Doppelstrang-Synthese wurden mit dem *Superscript Double-Stranded cDNA Synthesis Kit* nach Angaben des Herstellers für Gesamt-RNA mit weniger als 25 µg durchgeführt. Die Pipettierschemata sind im Folgenden tabellarisch dargestellt.

Ansetzen des RT-Reaktionspuffers:

	Volumen	Endkonzentration
5 x <i>First Strand Reaction Buffer</i> [250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl ₂]	4 µl	1x
0,1 M DTT	2 µl	10 mM
10 mM dNTPs (je 10 mM dATP; dGTP; dCTP und dTTP)	1 µl	0,5 mM

Diese Mischung sowie die denaturierte RNA wurden separat für 2 min. bei 42 °C vorinkubiert. Danach wurden die Ansätze unter Zugabe der reversen Transkriptase vereinigt:

Zugabe der denaturierten RNA mit Oligo-dT-Primer	12 µl	5µM Primer
200 U / µl <i>Superscript II</i> Reverse Transkriptase	1 µl	10 U / µl
Gesamtvolumen	20 µl	

Der vollständige RT-Reaktionsansatz wurde 1 h bei 42 °C weiter inkubiert. Die Zweitstrangsynthese wurde durch Zugabe folgender Reagenzien in 150 µl angestzt:

	Volumen	Endkonzentration
RT-Produkt	20 µl	
H ₂ O-DEPC	91 µl	
5xSecond Strand Reaction Buffer [100 mM Tris-HCl, pH 6,9; 450 mM KCl; 23 mM MgCl ₂ ; 0,75 mM β-NAD ⁺ ; 50 mM (NH ₄) ₂ SO ₄]	30 µl	1x
10mM dNTPs	3 µl	0,25 mM
10U / µl <i>E.coli</i> DNA-Ligase	1 µl	0,067 U / µl
10U / µl <i>E.coli</i> DNA-Polymerase	4 µl	0,27 U / µl
2U / µl RNase H	1 µl	0,013 U / µl
Gesamtvolumen	150 µl	

Dieser Ansatz wurde 2 h bei 16 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 10 U in 2 µl T4-DNA-Polymerase zugesetzt und weitere 5 min. bei 16 °C inkubiert. Schließlich wurde das doppelsträngige cDNA-Produkt mit 10 µl einer 0,5 M Lösung (Endkonzentration 3 mM) EDTA versetzt und auf Eis gestellt.

2.3.1.13.4 Aufreinigung der doppelsträngigen cDNA

Die Aufreinigung der doppelsträngigen cDNA wurde mit Hilfe des *GeneChip Sample Cleanup* Moduls durchgeführt. Bei dieser Reinigung werden die doppelsträngige cDNA an eine Säulen-Matrix gebunden und kontaminierende Bestandteile mit Hilfe von Waschpuffern durch Zentrifugation entfernt. Zunächst wurde das Produkt der Erst- und Zweitstrangsynthese mit 600 µl *cDNA Binding Buffer* versetzt und gevortext. Danach wurde dieses Gemisch auf eine *IVT cRNA Cleanup Spin-Säule* geladen, eine Minute bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Zum Waschen wurden 750 µl *cDNA Wash Buffer* auf die Säule gegeben und 1 min. zentrifugiert. Zur Entfernung der Restflüssigkeit aus der Säule wurde diese weitere 5min. zentrifugiert. Die Säule wurde schließlich 1 min. mit 14 µl auf 50 °C erwärmten *cDNA Elution Buffer* inkubiert und die cDNA durch einminütige Zentrifugation in ein 1,5 ml Reaktionsröhrchen eluiert. Die Elution wurde mit 11 µl des Elutionspuffers wiederholt.

2.3.1.13.5 Synthese und Markierung der cRNA

Die *in vitro* Transkription (IVT) wurde mit Hilfe des Enzo *Bioarray HighYield RNA Transcript Labeling Kit* nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Reaktion wurde mit

11 µl (ca. 1 µg) der gereinigten doppelsträngigen cDNA nach folgendem Pipettierschema in einem Gesamtvolumen von 20 µl angesetzt:

	Volumen	Endkonzentration
Doppelsträngige cDNA-Probe	11 µl	
10 x <i>HY-Reaction Buffer</i>	2 µl	1 x
10 x Lösung mit biotinylierten Ribonukleotiden (ATP, GTP, CTP, UTP, Bio-UTP und Bio-CTP)	2 µl	1 x
10 x DTT	2 µl	1 x
10 x <i>RNase Inhibitor-Mix</i>	2 µl	1 x
20 x Lösung mit T7-RNA Polymerase	1 µl	1 x
Gesamtvolumen	20 µl	

Der Ansatz wurde für 5 h bei 37 °C inkubiert und alle 30 min. gemischt.

2.3.1.13.6 Aufreinigung und Fragmentierung der cRNA

Die Aufreinigung der cRNA wurde ebenfalls mit dem *GeneChip Sample Cleanup* Modul durchgeführt. Das Produkt der IVT (20 µl) wurde mit 80 µl RNase-freiem Wasser, 350 µl IVT *cRNA Binding Buffer* und 250 µl Ethanol vermischt, auf eine *IVT cRNA Cleanup Spin-Säule* gegeben und 20 sec. bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert. Der Durchfluss wurde ein zweites Mal auf die Säule gegeben, zentrifugiert und anschließend verworfen. Nach Befüllung der Säule mit 500 µl 80 %igem Ethanol wurde erst 1 min. und zur Entfernung von Restflüssigkeit aus der Säule für weitere 5 min. zentrifugiert. Die cRNA wurde nach einminütiger Inkubation mit 17 µl auf 50 °C erwärmten, RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation für 1 min. in ein 1,5 ml Reaktionsröhrchen eluiert. Die Eluation wurde mit einem Volumen von 11 µl wiederholt.

Die Konzentration der cRNA wurde durch OD-Messung ermittelt. Die Qualität der Präparation wurde extern bestimmt (vgl. Abschnitt 2.3.1.13.7). Die Fragmentierungsreaktion wurde mit 10 µg (mindestens 5 µg) der gereinigten, biotinylierten cRNA durchgeführt. Diese wurde mit 6 µl des 5 x Fragmentierungspuffers aus dem Affymetrix *GeneChip Sample Cleanup* Modul versetzt und mit H₂O-DEPC auf ein Gesamtvolumen von 30 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 35 min. bei 94 °C inkubiert, bevor er zur Hybridisierung auf dem *Microarray* bereitgestellt wurde.

2.3.1.13.7 Qualitätskontrolle der Gesamt-RNA und der cRNA

Die RNA-Präparationen nach der Extraktion aus MNCs und nach der *in vitro* Transkription der cDNA in cRNA wurden zur Qualitätsbestimmung am Biomedizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Verwendung des *Agilent 2100 Bioanalyzer* analysiert. Hierzu wurden jeweils 1 µl der RNA-Proben und eines Marker-RNA-Mixes definierter Längen mit Hilfe des *RNA 6000 Pico LabChip Kits* nach Angaben des Herstellers auf einen *RNA 6000 Pico Chip* beladen. Dieses System ist zur Analyse von RNA-Präparationen einer Konzentration von 200-5.000 pg / µl vorgesehen. Bei der Prozedur wird die Probe durch einen mit einer Gel-Matrix befüllten Separationskanal des Chips geleitet und elektrophoretisch aufgetrennt. Gleichzeitig wird die Nukleinsäure mit einem interkalierenden Farbstoff markiert. Durch Laser-induzierte Fluoreszenz wird der Fluss der gelelektrophoretisch aufgetrennten Moleküle detektiert und mit Hilfe der *Agilent 2100 Bioanalyzer* Software analysiert. Die Qualität der RNA wird anhand eines Elektropherogramms dargestellt, bei dem die gemessene Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit abgebildet wird. Das typische Erscheinungsbild einer intakten Gesamt-RNA-Präparation im Elektropherogramm zeichnet sich durch eine flache Verteilung der Fluoreszenzsignale im zeitlichen Verlauf und zwei hohe *Peaks*, die der 18 S und 28 S ribosomalen RNA entsprechen, aus. Degradierete RNA lässt sich anhand der Verschiebung der Verteilung entsprechend kürzeren RNA-Fragmenten zu kürzeren Zeiten (links) und der Abnahme der Fluoreszenzintensitäten der rRNA-*Peaks* erkennen. Intakte cRNA-Präparationen zeichnen sich durch fehlende *Peaks* der rRNA-Kontaminationen und einen breiten *Peak* geringer Fluoreszenzintensität aufgrund der größeren Häufigkeit von RNA-Molekülen mittlerer Länge aus.

2.3.1.13.8 Hybridisierung der cRNA und Scannen der *Microarrays*

Für die Genexpressionsanalysen wurden Affymetrix *HG-Focus GeneChips* verwendet. Dieser *Microarray* umfasst 8.793 *probe sets* für die Detektion der Expression von Genen, die ein breites Spektrum unterschiedlicher zellulärer Funktionen repräsentieren. Die Hybridisierung der cRNA, das Waschen und Färben der *Microarrays* sowie die Messung der Fluoreszenz wurden von einem Mitarbeiter des Instituts für Onkologische Chemie im Rahmen einer *Core-Facility*, der Kooperation verschiedener Kliniken der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, durchgeführt.

Je 10 µg (mindestens 5 µg) in 30 µl der fragmentierten, biotinylierten cRNA-Präparationen wurden auf je einen *Microarray* geladen und über Nacht zur Hybridisierung bei 45 °C in einem Affymetrix *GeneChip Hybridization Oven* inkubiert. Wasch- und Färbeschritte wurden mit Hilfe der Affymetrix *GeneChip Fluidics Station 400* nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach einem Waschschrift zur Entfernung nicht gebundener RNA-Moleküle wurden die *Microarrays* mit SAPE markiert. Zur Verstärkung des Signals wurden die *Arrays* zusätzlich mit biotinylierten Anti-Streptavidin-Antikörpern und einer zweiten SAPE-Lösung inkubiert. Nicht gebundene Moleküle wurden in weiteren Waschschriften entfernt.

2.3.1.13.9 Ermittlung der differenziell exprimierten Gene

Die Intensitäten der Fluoreszenzsignale der so behandelten *Microarrays* wurden mit Hilfe des Affymetrix *Agilent GeneArray Scanners 2500A* mit einer Auflösung von 3 µm Pixeln gemessen. Die Primärdaten wurden mit Hilfe der Affymetrix *MicroArray Suite 5.0* Software auf einem angeschlossenen Computer analysiert und digitalisiert. Die Daten wurden von einem Informatiker der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf statistisch ausgewertet. Die Qualitätskontrolle, Normalisierung und Datenanalyse erfolgte mit dem *affy* Paket, das Funktionen der statistischen Skriptsprache „R“ enthält. Die Qualität der Probe und der Hybridisierung wurde mit Hilfe von Histogrammen der *perfect match* Intensitätsverteilungen, 5´ nach 3´ RNA-*Degradationsplots* oder *Scatter-Plots* überprüft. Die Normalisierung der Rohdaten der einzelnen *Microarrays* erfolgte mit der VSN-Methode (*Variance Stabilization Normalization*). Differenziell exprimierte Gene in IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs wurden mit Hilfe des SAM (*Significance Analysis of Microarrays*) -Algorithmus v1.21 für ungepaarte Proben identifiziert. Dieser Algorithmus beinhaltet eine gleitende Skala für die *false discovery rate* (FDR) für signifikant hoch- oder herunterregulierte Gene. Alle Daten wurden unter Verwendung des Zwei-Klassen-Modus für ungepaarte Daten des Algorithmus´ über 1.000 Zyklen permutiert. Als Schwellenwert für die Signifikanz wurde durch Einstellung des Parameters Delta eine FDR von 5 % festgelegt. Der Wert für die Signifikanz des Expressionsunterschiedes eines Gens in IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs wurde durch den q-Wert ausgedrückt (kleinste FDR, bei der ein Gen als signifikant unterschiedlich exprimiert betrachtet wird). Die differenzielle Expression eines einzelnen Gens wurde durch einen q-Wert ≤ 5 % definiert.

Das Verhältnis zwischen den gemittelten Fluoreszenzintensitäten für ein Gen in IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs (*fold change*) ist proportional zum Verhältnis zwischen den mittleren mRNA-Mengen dieses Gens in beiden DC-Gruppen. Um die Zahl der differenziell exprimierten Gene zu reduzieren, wurden zunächst nur Gene mit einer mindestens zweifachen *fold change* betrachtet. Für die Analyse von NK-Zell- und plasmazytoiden DC-Markern wurden alle differenziell exprimierten Gene mit einem q-Wert ≤ 5 % einbezogen. Hierarchische *Cluster*-Analysen auf Grundlage ausgewählter Gene wurden mit Hilfe der 'hclust' Funktion durchgeführt.

2.3.1.14 Quantitative Real-Time-PCR zur Verifizierung der *Microarray*-Daten

2.3.1.14.1 cDNA-Synthese

Die cDNA für die Verifizierung der *Microarray*-Analysen wurde aus denselben Gesamt-RNA-Präparationen hergestellt, die auch für die *Microarray*-Hybridisierungen verwendet wurden. Jeweils 100 ng Gesamt-RNA wurden mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 20 μ l verdünnt, 5 min. bei 65 °C denaturiert und anschließend 7 min. auf Eis gestellt. Die reverse Transkription wurde in einem Volumen von 40 μ l in einem 200 μ l PCR-Reaktionsröhrchen angesetzt. Der fertige Ansatz enthielt 100 ng denaturierter Gesamt-RNA, 2,5 mM dNTPs, 15 ng / μ l N6 *random* Primer, 1 mM DTT, 6,25 U / μ l M-MLV reverse Transkriptase, 1 x Reaktionspuffer und 0,65 U / μ l RNasin / RNase-Inhibitor. Das Gemisch wurde erst 2 h bei 37 °C und anschließend 10 min. bei 65 °C inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde das cDNA-Produkt über Nacht bei 4 °C oder länger bei -20 °C gelagert.

2.3.1.14.2 Real-Time-PCR

Die cDNA wurde unter Verwendung der *Assays-on-Demand Gene Expression Products* und des *TaqMan Universal PCR Master Mixes* auf einem *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System Instrument* nach Angaben des Herstellers amplifiziert. Die Firma Applied Biosystems bietet Sonden, Primer und Reaktionspuffer zur relativen Quantifizierung spezifischer cDNA-Moleküle mittels quantitativer Real-Time-PCR (RQ-PCR) als fertige optimierte Gemische an. Die Amplifikation wird bei definierten konstanten Bedingungen für alle Nachweisreaktionen durchgeführt. Folgende *Assays-on-Demand Gene Expression Products* wurden verwendet: CCL8 (Hs00271615_m1), BCL2A1 (Hs00187845_m1), GZMB (Hs00188051_m1), CCR7 (Hs00171054_m1), LAMP3 (Hs00180880_m1), PRKR (= PKR)

(Hs00169345_m1), ADAMDEC1 (Hs00205545_m1), FCGR1A (Hs02340030_m1), PDHA1 (Hs00264851_m1), CCND2 (Hs00153380_m1) and B2M (Hs00187842_m1). Die Amplifikationsansätze wurden jeweils in einem Volumen von 20 µl in einer 96-Well-Platte im Duplikat pipettiert:

	Volumen	Endkonzentration
2 x <i>TaqMan Universal PCR Master Mix</i> (enthält <i>AmpliTaq Gold</i> DNA-Polymerase, <i>AmpErase</i> Uracil-N-glykosylase, dNTPs incl. dUTP, einen passiven Referenzfarbstoff und optimierten Puffer)	10 µl	1 x
20 x <i>Assays-on-Demand Gene Expression Assay Mix</i> (enthält 18 µM Vorwärts- und Rückwärts-Primer und 5 µM <i>TaqMan</i> - Sonde)	1 µl	1 x (0,9 µM Primer und 0,5 µM Sonde)
H ₂ O	7 µl	
cDNA	2 µl	
Gesamtvolumen	20 µl	

Die beladene 96-Well-Platte wurde anschließend mit einer transparenten Klebefolie abgedichtet und 10 sec. bei 3.000 g zentrifugiert. Die Amplifikation wurde auf dem *ABI PRISM 7900HT* System mit folgendem Programm durchgeführt: 1. 2 min. 50 °C; 2. 10 min. 95 °C zur Aktivierung der Enzyme; 3. 15 sec. 95 °C zur Denaturierung; 4. 1 min. 60 °C für die Bindung der Primer und Sonden und zur Amplifikation. Schritte 3. und 4. wurden in 40 Zyklen wiederholt. C_t-Werte wurden mit Hilfe der *ABI PRISM* Software bei einer *threshold* von 0,1 berechnet. Als Referenz wurde die Amplifikation der β₂-Mikroglobulin-cDNA herangezogen. Dieses Gen wird häufig als Referenz verwendet und zeigte bei den *Microarray*-Analysen verglichen mit anderen *Housekeeping*-Genen eine starke und sehr homogene Expression in allen Proben. Die Differenz der C_t-Werte für ein untersuchtes Gen und für das β₂-Mikroglobulin-Gen (ΔC_t-Wert) ist ein auf die Expression des *Housekeeping*-Gens normalisiertes, logarithmisches Maß für die mRNA-Menge des untersuchten Gens in einer Probe. Entsprechend wurde der Unterschied in der Expression dieses Gens in den beiden DC-Gruppen durch die Differenz der gemittelten ΔC_t-Werte der verschiedenen IFN-DC- bzw. IL-4 / TNF-DC-Präparationen für dieses Gen, den ΔΔC_t-Wert, ausgedrückt. Der ΔΔC_t-Wert ist ein logarithmisches Maß für das mRNA-Mengenverhältnis der beiden DC-Populationen. Für den direkten Vergleich der Ergebnisse der RQ-PCR mit den *Microarray*-Daten wurden daher die ΔΔC_t-Werte mit dem log₂ der *fold change* aus der *Microarray*-Analyse (vgl. Abschnitt 2.3.1.13.9) der entsprechenden Gene verwendet und graphisch dargestellt. Alle Berechnungen sowie die graphische Darstellung wurden mit Hilfe des *Excel*-Programms durchgeführt.

2.3.2 Vakzinierung von Patienten mit Multiplem Myelom mit CDR3-Peptid-beladenen dendritischen Zellen

2.3.2.1 Molekularbiologische Methoden zur Identifizierung der CDR3-Sequenz

2.3.2.1.1 Gewinnung der cDNA

Zur Ermittlung der CDR3-Sequenz wurden MNCs durch Dichtegradientenzentrifugation aus Knochenmarkproben mit hoher Tumorzellinfiltration von Patienten mit Multiplem Myelom gewonnen. Die Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des *RNeasy Mini Kits* nach Angaben des Herstellers aus den MNCs isoliert. Je 3 µl der RNA wurden 5 min. bei 65 °C denaturiert und in einem Volumen von 20 µl in PCR-Puffer II mit 5 mM MgCl₂, je 0,25 mM dNTPs, 2,5 µM Oligo (dT)₁₆-Primer, 2,5 U / µl MuLV reverse Transkriptase, 1 U / µl RNase-Inhibitor bei 42 °C für 15 min. und 99 °C für 5 min. revers transkribiert.

Die cDNA-Synthese der variablen Region der schweren Immunglobulin-Kette wurde mit Hilfe der Konsensus-Primer FR1c, J_H1245, J_H3 und J_H6 durchgeführt (vgl. **Tabelle 6.3**). Die Reaktion wurde in einem Volumen von 100 µl mit folgenden Reagenzien angesetzt: 20 µl des RT-Produktes, je 1 µM der Primer FR1c, J_H1245, J_H3 und J_H6, 1 x PCR-Puffer und 0,025 U / µl *AmpliTaq*-Polymerase. Die Amplifikation wurde mit folgendem Programm durchgeführt: 5 min. Vorheizen bei 94 °C, 40 Zyklen mit 1 min. Denaturierung bei 94 °C, 1 min. Bindung der Primer bei 60 °C und 2 min. Elongation bei 72 °C, gefolgt von einer finalen Extension für 8,5 min. bei 72 °C.

Je 16 µl der cDNA-Präparationen wurden in einem 1,5 %igen (w / v) Agarose-TBE-Gel mit 0,03 % Ethidiumbromid gelelektrophoretisch bei einer Stromstärke von 120 mA aufgetrennt. Die Klon-spezifische cDNA-Bande, die einer Nukleotidlänge von 300-500 bp entspricht, wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die cDNA wurde nach Angaben des Herstellers mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* aus dem Agarose-Gel extrahiert und in 50 µl EB-Puffer (10 mM Tris pH 8,5) eluiert.

2.3.2.1.2 Klonierung der cDNA-Fragmente in *E.coli*-Bakterien

Die extrahierte cDNA wurde mit Hilfe des *TOPO TA Cloning Kits* nach Angaben des Herstellers in einen *pCR2.1 TOPO*-Vektor ligiert und in *E.coli*-Bakterien kloniert. Vor der Ligation wurden je 2 µl der extrahierten cDNA erneut mit PCR-Puffer, 0,02 U / µl *AmpliTaq*-Polymerase und 1 mM dATP in einem Volumen von 28 µl 15 min. bei 72 °C inkubiert. Zur

Ligation wurden 4 µl dieses Ansatzes mit je 1 µl Salzlösung und *TOPO*-Vektor 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert.

Für die Herstellung von Agar-Platten wurde LB-Medium mit 1,5 % (w / v) Agarose und 0,5 mg / ml Ampicillin verwendet. Die Agar-Platten wurden mit 40 µl je Platte einer Lösung mit IPTG und x-Gal bestrichen. Die Transformation der kompetenten *E.coli*-Bakterien mit dem Ligationsprodukt wurde nach Angaben des Herstellers mit dem *TOPO TA Cloning Kit* durchgeführt. Die transformierten Bakterien wurden dann auf den Agar-Platten ausgestrichen und zur Kolonien-Bildung über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Je Patient wurden 10 einzelne weiße Kolonien in Ampicillin-haltiges LB-Medium überführt und zum Bakterien-Wachstum über Nacht bei 37 °C inkubiert. Schließlich wurde die Plasmid-DNA aus einzelnen Bakterien-Kolonien unter Verwendung des *QIAprep Miniprep Kits* für die Isolierung von Plasmid-DNA nach Angaben des Herstellers extrahiert und in 50 µl EB-Puffer eluiert. Die Konzentration der gereinigten Plasmid-DNA wurde durch OD-Messung bestimmt.

2.3.2.1.3 Ermittlung der CDR3-Sequenz und Herstellung des CDR3-Peptids

Die Sequenzierung der CDR3-Region wurde extern durch die Firma SeqLab in Göttingen durchgeführt. Hierzu wurden etwa 600 ng des Plasmids mit 20 pmol eines M13 Vorwärts-Primers, der 5' der Integrationsstelle bindet, an die Firma verschickt. Das Ergebnis der Sequenzierung wurde als Text- und Graphik-Datei per e-mail gesendet.

Identische Sequenzen sowie die Bindungssequenzen für die Konsensus-Primer wurden mit Hilfe der *ALFwin Sequence Analyser v2.10.06* Software identifiziert. Wenn die Sequenzen von mindestens drei von 10 verschiedenen Klonen identisch waren, wurde diese Sequenz als die Patienten- und Tumor-spezifische IgH-Sequenz definiert. Mit Hilfe der *IgBlast* Software wurden die V_H-, D- und J_H-Sequenzen sowie die Patienten-spezifische CDR3-Peptid-Sequenz identifiziert. Basierend auf diesen Aminosäuresequenzen wurde die Synthese der CDR3-Peptide bei der Firma SeqLab in Auftrag gegeben. Die Peptidsequenz wurde so gewählt, dass sie eine Subsequenz von 9 Aminosäuren mit guten Bindungseigenschaften an die entsprechenden HLA (menschliches Leukozytenantigen) - Klasse I-Moleküle des jeweiligen Patienten beinhaltet. Dies wurde mit Hilfe der *HLA Peptide Binding Prediction* Software auf der *Bioinformatics and Molecular Analysis Section* (BIMAS) Homepage (http://bimas.dcrf.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform) überprüft (Daten nicht gezeigt). Das CDR3-Peptid wurde als lyophilisiertes Pulver à 10mg geliefert. Parallel wurde es auch als KLH-gekoppeltes Konjugat geliefert.

2.3.2.2 Herstellung, Beladung und Verabreichung der dendritischen Zellen

Im Rahmen eines individuellen Heilversuchs wurden zwei Patienten mit Multiplem Myelom (und ein Patient mit B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom) nach deren Einverständniserklärung und der Zustimmung der lokalen Ethikkommission mit *in vitro* generierten und mit spezifischem CDR3-Peptid beladenen IFN-DCs oder IL-4 / TNF-DCs behandelt.

IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs wurden wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben nach dem Adhärenz-Verfahren unter GMP-Bedingungen aus frisch gewonnenen Apheresaten generiert. Beim Aphereseverfahren wird Blut des Spenders aus der Armvene entnommen, in einem geschlossenen, sterilen Schlauchsystem mit einer Antikoagulanzlösung vermischt und in eine Zentrifuge geleitet. Hierbei werden die verschiedenen Blutkomponenten aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte aufgetrennt. Die Leukozyten-angereicherte Fraktion, das Apheresat, wird entnommen, während die restlichen Komponenten dem Spender zurückgegeben werden.

Nach drei- bzw. fünftägiger Kultur wurden die IFN-DCs bzw. unreifen IL-4-DCs geerntet und bis zur Verwendung in Aliquots à 1×10^7 Zellen kryokonserviert. Am Tag der Applikation des DC-Vakzins wurde jeweils ein Aliquot der kryokonservierten IFN-DCs aufgetaut. Nach Waschen mit PBS wurde das Zellpellet in 1 ml einer isotonen Kochsalzlösung resuspendiert und für 2 h bei 37 °C zur Aufnahme des Peptids durch die DCs inkubiert. IL-4-DCs wurden zwei Tage vor der Applikation aufgetaut und in Anwesenheit von 100 µg / ml Patientenspezifischem CDR3-Peptid mit 800 U / ml GM-CSF und 1.000 U / ml TNF-α für zwei Tage inkubiert, dann gewaschen und in 1 ml isotoner Kochsalzlösung resuspendiert. Die so mit CDR-3-Peptid beladenen DCs wurden den Patienten subkutan in den Oberschenkel appliziert. In dieser Arbeit werden die Ergebnisse der Vakzinierung der beiden Patienten mit Multiplem Myelom dargestellt. **Tabelle 2.1** fasst die Hintergrundinformationen der beiden Patienten mit Multiplem Myelom zusammen:

Tabelle 2.1: Charakteristika der vakzinierten Patienten mit Multiplem Myelom

	Alter bei Beginn der Vakzinierung / Geschlecht	Verlauf der Behandlung vor Vakzinierung	Klinisches Bild vor Beginn der Vakzinierung	Zahl und Typ der verabreichten DCs
Patient 1	46 / m	HDT + auto	Remission (26 Monate nach HDT)	$4 \times 1 \times 10^7$ IL-4 /TNF-DCs
Patient 2	60 / w	2. HDT + auto	Anstieg des Paraproteins (36 Monate nach 2. HDT)	$4 \times 1 \times 10^7$ IFN-DCs

Abkürzungen: m, männlich; w, weiblich; HDT + auto, Hochdosis-Chemotherapie mit autologer Blutstammzelltransplantation.

Patient 1 erhielt im Abstand von einem Monat insgesamt 4 Applikationen von jeweils 1×10^7 mit spezifischem CDR3-Peptid beladenen IL-4 / TNF-DCs. Im Anschluss folgten 4 *Booster*-Applikationen mit 100 µg / ml an KLH gekoppeltem, spezifischem CDR3-Peptid, um die immunisierende Wirkung der Vakzine zu verstärken.

Patient 2 erhielt im Abstand von einem Monat insgesamt 4 Applikationen von jeweils 1×10^7 mit spezifischem CDR3-Peptid beladenen IFN-DCs, ebenfalls gefolgt von 4 *Booster*-Applikationen mit 100 µg / ml an KLH gekoppeltem, spezifischem CDR3-Peptid.

2.3.2.3 Serologisches und molekulares Monitoring der vakzinierten Patienten

Im Verlauf der Therapie wurden zur Untersuchung des Ansprechens der Patienten auf die Therapie serologische Parameter zur Krankheitsaktivität ermittelt als auch molekularbiologische Untersuchungen von peripheren Blut- und Knochenmarkproben durchgeführt.

2.3.2.3.1 Serologische Parameter

Der wichtigste Parameter zur Bestimmung der Aktivität des malignen Plasmazellklons ist die Präsenz des Klon-spezifischen Immunglobulins (Paraprotein) im Blut der Patienten. In regelmäßigen Abständen wurden den Patienten periphere Blutproben entnommen. Die Konzentration des Paraproteins in diesen Proben wurde routinemäßig in einem Analyselabor der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit Hilfe der ELISA-Technik ermittelt.

2.3.2.3.2 Detektion der minimalen Resterkrankung im peripheren Blut mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR

Klon-spezifische IgH-DNA-Sequenzen sind in genau einer Kopie je Tumorzelle vorhanden, so dass die Messung der IgH-Kopienzahl mittels RQ-PCR ein direktes Maß für die Tumorzellzahl in einer Probe ist. Die RQ-PCR zum quantitativen Nachweis der Patientenspezifischen IgH-Sequenzen wurde wie von Fenk *et al.* beschrieben auf dem *LightCycler*-System durchgeführt [111]. Für jeden Patient wurde eine eigene PCR etabliert.

2.3.2.3.2.1 Synthese von Patienten-spezifischen Primern und Sonden für die individuelle CDR3-Sequenz

Anhand der ermittelten CDR3-Sequenzen (Abschnitt 2.3.2.1.2) wurde von der Firma TIBMOLBIOL (Berlin) je eine Allel-spezifische Oligonukleotid (ASO) -*Taqman*-Sonde für die Tumor-spezifische CDR3-Region der einzelnen Patienten sowie ASO-Vorwärts- und Rückwärts-Primer entworfen und synthetisiert.

2.3.2.3.2.2 Etablierung einer Patienten-spezifischen, quantitativen Real-Time-PCR zur Quantifizierung der CDR3-Sequenz

Zur Etablierung der Patienten-spezifischen IgH-PCR wurde zunächst eine serielle Verdünnungsreihe der Plasmide in Anwesenheit von 6 ng / ml MS2 Phagen-RNA angesetzt und die Amplifikation bei verschiedenen MgCl₂-Konzentrationen mit 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM oder 7 mM mit jeweils 1x10⁷, 1x10⁶, 1x10⁵ oder 1x10⁴ Plasmid-Kopien getestet. Die Kopienzahl ließ sich aus der Konzentration (w / v) und der Größe des Plasmids sowie der mittleren molekularen Masse der Basenpaare berechnen, mit einer molekularen Masse des Plasmids von (4.300 x 650g) / 6,022x10²³ Molekülen = 0,46 ng / 1x10⁸ Plasmid-Kopien. Vor dem Einsatz der Plasmide in der RQ-PCR wurden diese zunächst in einer Konzentration von 5x10⁷ Kopien / µl mit 1 U / µl des Restriktionsenzym PstI in 1 x Puffer durch einstündige Inkubation bei 37 °C linearisiert. Das Enzym wurde anschließend bei 95 °C für 10 min. inaktiviert.

Die PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung des *LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes Kits* nach Angaben des Herstellers in einem Volumen von 20 µl in *LightCycler*-Kapillaren angesetzt. Jeder Ansatz für die IgH-PCR enthielt 1 x *LightCycler Hybridisation Probes Reaction Mix* (mit einer *FastStart Taq*-Polymerase), je 0,5 mM der ASO Vorwärts- und Rückwärts-Primer, 200 nM ASO-*Taqman*-Sonde, eine definierte MgCl₂-Konzentration und eine definierte Plasmid-Kopienzahl. Die PCR wurde unter folgenden Temperatur-Bedingungen durchgeführt: 1. 10 min. Vorinkubation bei 95 °C; 2. 45 Zyklen mit einem Denaturierungsschritt bei 95 °C ohne Haltezeit und einem Amplifikationsschritt bei 60 bzw. 63 °C für 30 sec. (in Abhängigkeit von den vorgeschlagenen Bindungstemperaturen für Sonde und Primer für die beiden Patienten); 3. Kühlung für 5 min. bei 40 °C. Für die Detektion der Fluoreszenz wurden folgende Instrument-Einstellungen vorgenommen: Akquisitionseinstellung am Ende der Amplifikation: einzel; Kanäle: F1 / F2; Fluorimeter-

Verstärkung: automatisch. Die Daten wurden unter Verwendung der *LightCycler* Software 3.5 ausgewertet und graphisch dargestellt.

Für die erfolgreiche Etablierung der Patienten-spezifischen PCR wurden drei Bedingungen gefordert:

1. Die Amplifikation der DNA sollte eine annähernd optimale Effizienz mit $E = 10^{-1/m} - 1 = 1$ besitzen, d.h. pro Zyklus sollte sich die amplifizierte DNA möglichst genau verdoppeln. Dies ist gewährleistet, wenn die Steigung m der Standard-Kurve, die mit einer seriellen 10-fachen Verdünnungsreihe des spezifischen Plasmids erstellt wurde, $3,32 \pm 0,5$ beträgt.
2. In der seriellen Verdünnungsreihe des spezifischen Plasmids bis theoretisch 10^{-2} Kopien sollte eine Plasmidkopie in 660ng genomischer DNA, was einer maximalen Sensitivität von 10^{-5} entspricht, noch nachgewiesen werden können. Eine lineare Abhängigkeit der *Crossing-Points* von der Plasmidkonzentration sollte bis zu einer Kopienzahl von 10 Plasmiden gewährleistet sein, was einer linearen Sensitivität von 10^{-4} entspricht.
3. Die Spezifität der IgH-PCR sollte bestätigt werden. Hierzu sollten PCR-Ansätze mit den Patienten-spezifischen Sonden und Primern und 660 ng DNA von gesunden Spendern, anderen Patienten oder aus angereicherten CD19+ B-Zellen eines gesunden Spenders durchweg negative Ergebnisse zeigen.

2.3.2.3.2.3 Quantifizierung der CDR3-Sequenz in mononukleären Zellpräparationen

Zur Quantifizierung der Tumorzellzahl in Blut- oder Knochenmarkproben wurde die genomische DNA aus den MNCs dieser Proben mit Hilfe des *QIAamp DNA Blood Mini Kit* nach Angaben des Herstellers isoliert und in 70 μ l Puffer AE (10 mM Tris-HCl, pH 9; 0,5 mM EDTA) eluiert. Die Konzentration der gereinigten genomischen DNA wurde mittels OD-Messung bestimmt. Die Proben wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Zur Detektion der IgH-Sequenzen in genomischen DNA-Präparationen wurden in den Ansätzen der IgH-PCR statt der Plasmid-DNA jeweils 660 ng der genomischen DNA eingesetzt. Als Standard wurde parallel im selben Experiment eine serielle Verdünnung der linearisierten Plasmide mit je 10^5 , 10^4 und 10^3 Kopien verwendet.

Als Referenz-Gen wurde das β -Aktin-Gen gewählt. Die *Taqman*-Sonde und Primer für das β -Aktin-Gen sowie genomische DNA eines gesunden Spenders wurden dem *Taqman β -Actin Control Reagents Kit* entnommen. Für die separate β -Aktin-PCR wurden in 20 μ l angesetzt: 1 x *LightCycler-FastStart Hybridisation Probes Reaction Mix*, 3,5 mM MgCl_2 , 0,3 mM β -Aktin-Vorwärts-Primer, 0,3 mM β -Aktin-Rückwärts-Primer, 200 nM β -Aktin-

Taqman-Sonde und die gleiche Menge genomischer Proben-DNA wie für die Patientenspezifische PCR bzw. verdünnte genomische DNA eines gesunden Spenders mit 6×10^3 , 6×10^2 bzw. 6×10^1 Kopien als Standard. Die β -Aktin-PCR wurde mit demselben Programm wie die Patientenspezifische PCR auf dem *Lightcycler*-System durchgeführt.

IgH- und β -Aktin-Kopienzahlen wurden für jede genomische DNA-Probe aus peripherem Blut oder Knochenmark der Patienten im Duplikat ermittelt. Negativ-Proben wurden zur Bestätigung insgesamt 5 mal gemessen. Der Anteil Klon-spezifischer Zellen in der untersuchten Probe wurde durch die Berechnung des Quotienten $\text{IgH-Kopienzahl} / 2 \times \beta\text{-Aktin-Kopienzahl}$ ermittelt. Die Formel erklärt sich aus der Tatsache, dass die IgH-Sequenz in einer B-Zelle nur als einzelnes Allel, das β -Aktin-Gen in jeder Zelle aber in zwei Kopien vorliegt.

2.3.3 Statistische Auswertungen

Die Berechnung von Mittelwerten, Standardabweichungen und Medianen der Messergebnisse sowie die Erstellung von Graphiken wurden mit dem *Excel*-Programm durchgeführt. Signifikante Unterschiede zwischen den Messergebnissen für die Proben unterschiedlicher Zellpräparationen wurden mittels ungepaartem, zweiseitigem *Student's t-test* ermittelt. Dabei wurde ein $p\text{-Wert} < 0,05$ als signifikant angesehen. Signifikante Unterschiede in der Genexpression wurden wie oben beschrieben mit Hilfe des SAM-Algorithmus' ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse von IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs

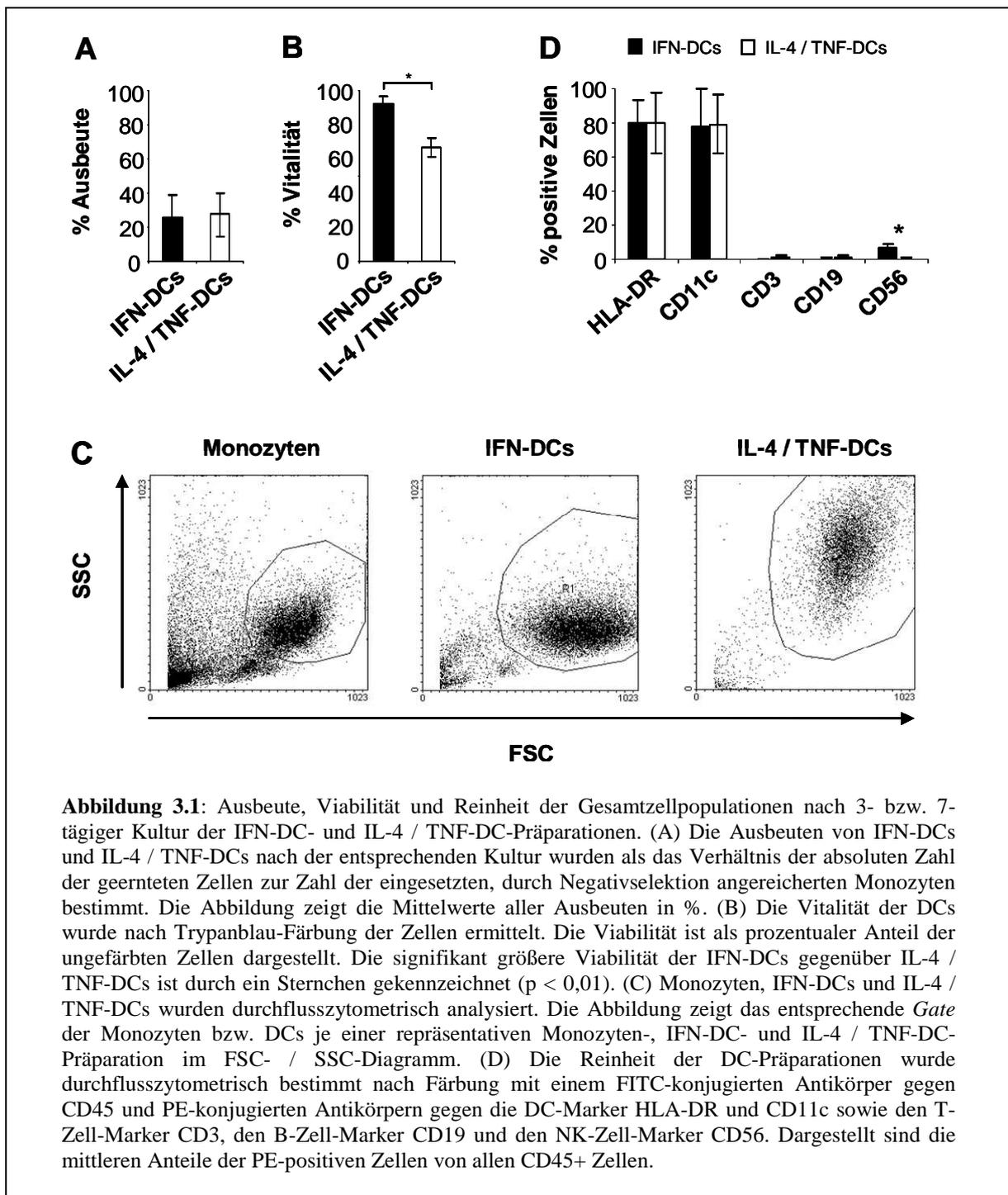
3.1.1 Ausbeute, Viabilität und Reinheit

Insgesamt wurden 16 IFN-DC- und 12 IL-4 / TNF-DC-Präparationen aus negativ selektionierten Monozyten hergestellt. Nach drei Tagen Kultur wurden die IFN-DCs und nach 7 Tagen Kultur die IL-4 / TNF-DCs geerntet. Im Mittel wurden $1,2 (\pm 0,6) \times 10^8$ negativ angereicherte Monozyten aus *Buffy-Coats* eingesetzt und $3,4 (\pm 2,6) \times 10^7$ DCs geerntet. Dies entspricht einer mittleren Ausbeute von 26 ± 13 %. Es zeigten sich dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Präparationen ($p = 0,8$) (**Abbildung 3.1A**). Die Färbung der DCs mit Trypanblau zeigte eine hohe Viabilität der IFN-DCs mit 97 ± 2 % vitalen Zellen nach der Kultur (**Abbildung 3.1B**). Im Vergleich dazu wiesen IL-4 / TNF-DCs eine signifikant geringere Viabilität von 87 ± 2 % vitaler Zellen nach der Kultur auf ($p = 0,008$). Die Reinheiten der Zell-Präparationen wurden durch zwei Methoden ermittelt. Einerseits wurde sie durchflusszytometrisch anhand der FSC- / SSC-Eigenschaften bestimmt, andererseits immunphänotypisch durch Färbung mit Antikörpern gegen CD45, CD3, CD14, CD19, CD56 sowie CD11c und HLA-DR. Für die Bestimmung der Reinheit wurden nur solche Ereignisse berücksichtigt, die positiv für CD45 als Marker für vitale Leukozyten waren.

In den Ausgangszellen zeigten im Mittel 74 ± 11 % der Zellen FSC- / SSC-Eigenschaften von Monozyten (**Abbildung 3.1C**, links). In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis konnte durch Antikörper-Färbung eine Reinheit von 71 ± 12 % CD14+ Monozyten von allen CD45+ Ausgangszellen im „Gesamt-Gate“ gemessen werden. Es konnte nur ein geringer Anteil von CD3+ T-Zellen, CD19+ B-Zellen und CD56+ NK-Zellen von insgesamt 3 ± 3 % detektiert werden.

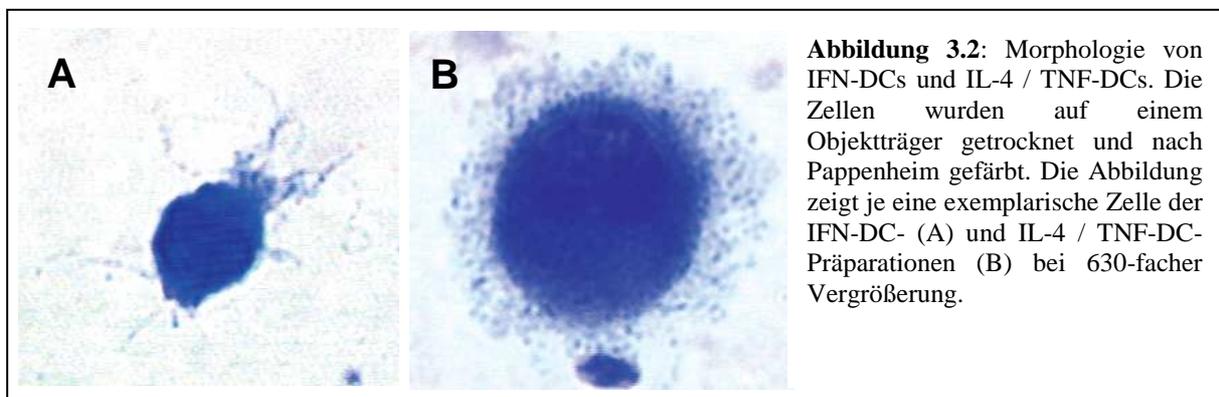
Nach der Kultur waren IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs im FSC- / SSC-Diagramm als klar abgrenzbare homogene Populationen großer Zellen zu erkennen. Die **Abbildung 3.1C** zeigt, dass sowohl IFN-DCs als auch IL-4 / TNF-DCs stärkere FSC-Werte als Monozyten aufwiesen, was auf eine Größenzunahme der DCs beider Präparationen gegenüber den Monozyten hinweist. IL-4 / TNF-DCs zeigten höhere SSC-Werte als IFN-DCs. Dies spricht für eine stärkere Granularität der IL-4 / TNF-DCs. Der Anteil von Zellen im „Gesamt-Gate“ mit FSC- / SSC-Eigenschaften von DCs betrug für beide Populationen 79 ± 16 %. Nach der Färbung mit einem Antikörper gegen den DC-assoziierten Marker HLA-DR zeigten beide

DC-Präparationen einen Anteil von 80 ± 16 % HLA-DR⁺ Zellen aller CD45⁺ Zellen (**Abbildung 3.1D**). Dieselben Reinheiten konnten auch mit einem Antikörper gegen CD11c ermittelt werden. Im Mittel konnten insgesamt 2 ± 2 % CD3⁺ und CD19⁺ Zellen in beiden DC-Präparationen nachgewiesen werden. In den IFN-DC-Präparationen konnte ein signifikant erhöhter Anteil an CD56⁺ Zellen beobachtet werden (6 ± 3 % in IFN-DCs vs. $0,4 \pm 0,4$ % in IL-4 / TNF-DCs, $p < 0,001$). Der größte Teil der Expression von CD56 konnte der IFN-DC-Population zugeordnet werden (vgl. Abschnitt 3.1.7).



3.1.2 Morphologie

Die mikroskopische Betrachtung der Zellpräparate in der Pappenheim-Färbung zeigte eine für DCs typische ähnliche Morphologie der IFN-DCs und der IL-4 / TNF-DCs (**Abbildung 3.2**). Beide DC-Präparationen zeigten einen peripher lokalisierten, nierenförmigen Zellkern und einen Saum zytoplasmatischer Fortsätze. IFN-DCs waren jedoch kleiner und hatten eine eher unregelmäßige Form. Das Kern-Plasma-Verhältnis war bei IFN-DCs zugunsten des Zellkerns verschoben. Die zytoplasmatischen Fortsätze der IFN-DCs waren meist polar angeordnet. Die IL-4 / TNF-DCs dagegen waren größer und hatten eine eher zirkuläre Morphologie. Alle Zellen der IL-4 / TNF-DC-Präparationen zeigten eine radiärsymmetrische Verteilung der zytoplasmatischen Fortsätze ohne erkennbare Polarisierung.



3.1.3 Immunphänotypische Charakterisierung

Zur immunphänotypischen Analyse der DC-Präparationen wurden je 8 IFN-DC- und 8 IL-4 / TNF-DC-Präparationen mit Antikörpern gegen Zelloberflächenmoleküle markiert, die mit der Differenzierung und Reifung von DCs assoziiert sind. DCs wurden anhand ihrer FSC- / SSC-Eigenschaften und der Expression des Leukozytenmarkers CD45 eingegrenzt (**Abbildung 3.3A**). Nur CD45⁺ Zellen der Population mit den DC-typischen hohen FSC- und SSC-Werten wurden für die Immunphänotypisierung betrachtet. Verglichen wurden sowohl die Ausgangspopulationen der Monozyten mit den DCs als auch die beiden DC-Populationen untereinander.

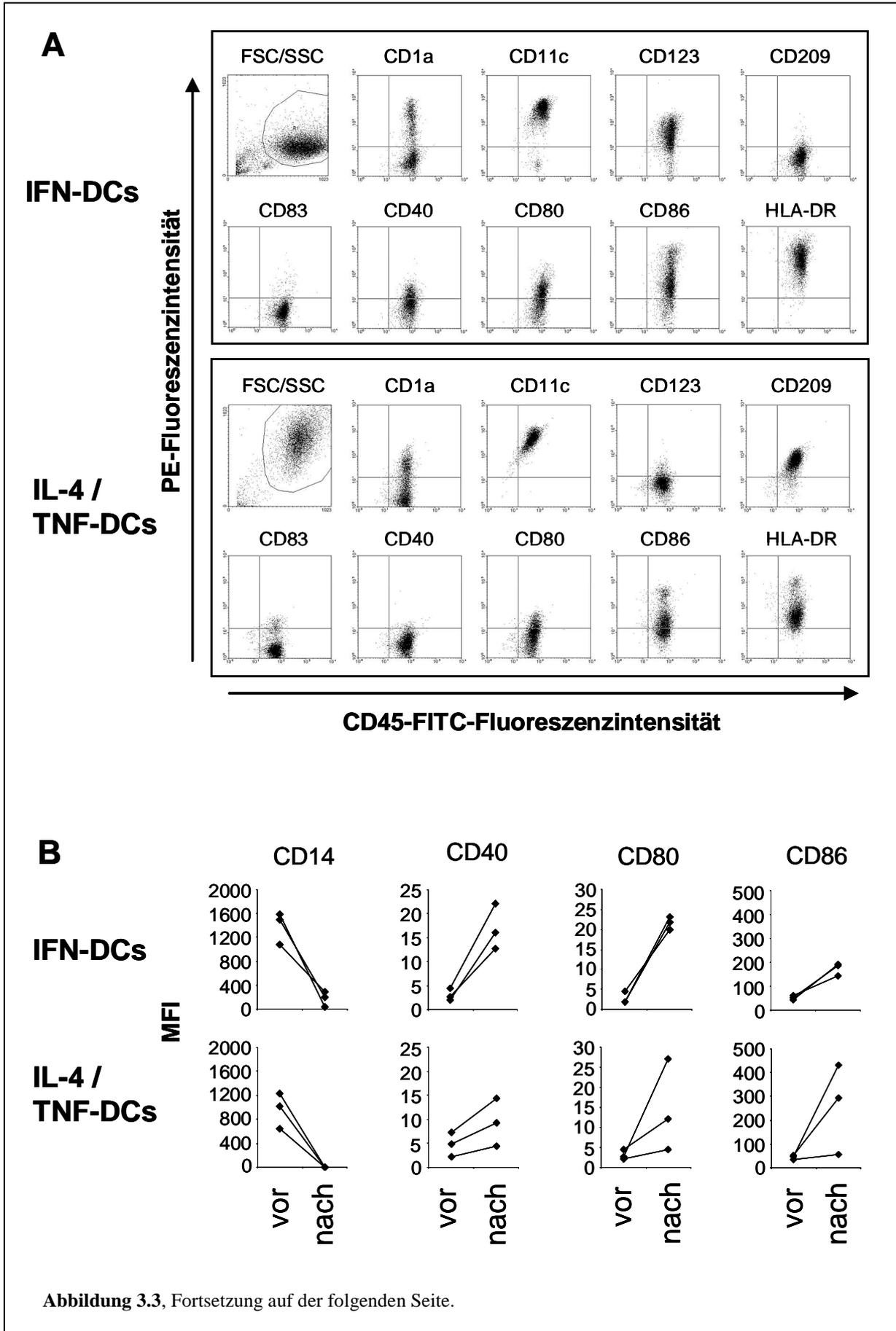
Der Vergleich der MFI-Werte von je drei IFN-DC- und IL-4 / TNF-DC-Präparationen mit den MFI-Werten der eingesetzten Monozyten zeigte eine deutliche Reduktion des Monozytenmarkers CD14 auf den DCs bei gleichzeitiger Zunahme der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 (**Abbildung 3.3B**).

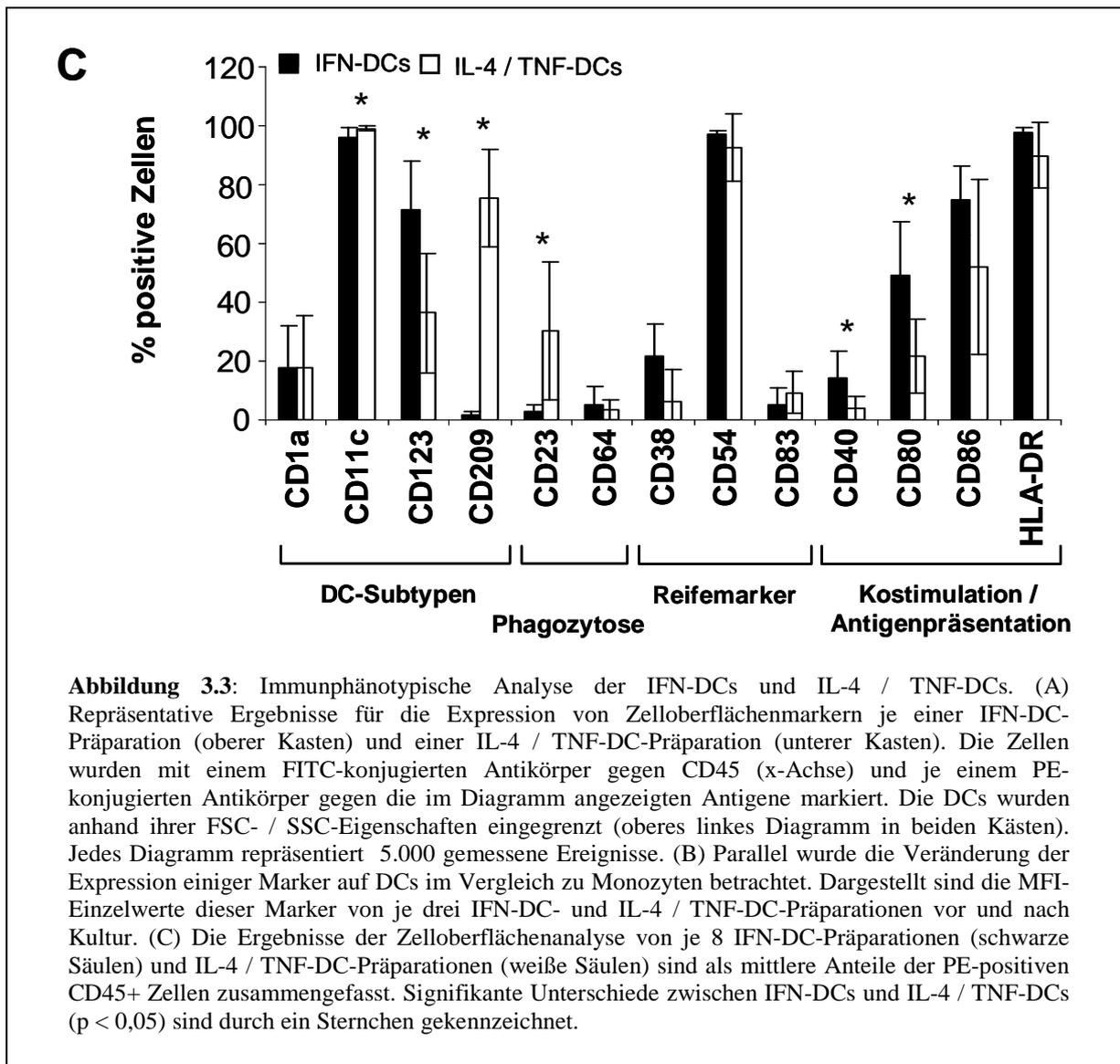
Wie in **Abbildung 3.3C** dargestellt, waren die Zellen beider DC-Präparationen positiv für CD11c, CD86 und HLA-DR, Zelloberflächenmoleküle, die typischerweise von myeloiden DCs exprimiert werden (CD11c: 96 ± 3 % für IFN-DCs vs. 99 ± 1 % für IL-4 / TNF-DCs, $p = 0,03$; CD86: 75 ± 12 % vs. 52 ± 30 %, $p = 0,08$ und HLA-DR: 98 ± 2 % vs. 90 ± 11 %, $p = 0,08$).

Darüberhinaus konnten Unterschiede in der Expression verschiedener anderer Zelloberflächenmoleküle detektiert werden, die mit verschiedenen DC-Subtypen, Phagozytose, dem Reifungszustand und T-Zell-stimulatorischen Potenzial von DCs assoziiert sind. Die Expression von drei Markern für verschiedene DC-Subpopulationen wurde untersucht. Der plasmazytoide DC-Marker CD123 konnte auf einem signifikant größeren Teil der IFN-DCs im Vergleich mit IL-4 / TNF-DCs nachgewiesen werden (72 ± 16 % vs. 36 ± 20 %, $p = 0,003$). Das Adhäsionsmolekül CD209 (= DC-SIGN) hingegen, das nur von einer speziellen myeloiden DC-Subpopulation exprimiert wird, konnte auf IL-4 / TNF-DCs (75 ± 17 %), jedoch kaum auf IFN-DCs (2 ± 1 %) detektiert werden ($p < 0,001$). Die Expression von CD1a, einem Marker, der von Langerhans-Zellen gebildet wird, war sehr heterogen in den unterschiedlichen Präparationen, wobei kein signifikanter Unterschied für diesen Marker zwischen IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs festgestellt werden konnte (18 ± 15 % vs. 18 ± 18 %, $p = 1$).

Desweiteren wurde die Expression von zwei Ig-Rezeptoren als Phagozytosemarker untersucht. Der IgE-Rezeptor CD23 (FcεRII) konnte auf einem signifikant größeren Anteil der IL-4 / TNF-DCs und nur auf sehr wenigen IFN-DCs detektiert werden (30 ± 23 % für IL-4 / TNF-DCs vs. 3 ± 3 % IFN-DCs, $p = 0,01$). Der IgG-Rezeptor CD64 (FcγRI) wurde auf einem geringen Prozentsatz beider Zellpopulationen nachgewiesen (5 ± 7 % für IFN-DCs vs. 3 ± 3 % für IL-4 / TNF-DCs, $p = 0,6$).

Verschiedene Marker, die mit der Reifung von DCs assoziiert sind, wurden untersucht. Der am häufigsten verwendete Marker für die DC-Reifung, CD83, konnte nur auf einem kleinen Teil der IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs nachgewiesen werden (5 ± 5 % für IFN-DCs vs. 9 ± 7 % für IL-4 / TNF-DCs, $p = 0,3$). Das interzelluläre Adhäsionsmolekül (ICAM-) 1 / CD54, welches typischerweise von reifenden DCs hochreguliert wird, konnte auf fast allen DCs ohne signifikanten Unterschied zwischen IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs nachgewiesen werden (97 ± 2 % für IFN-DCs und 93 ± 11 % für IL-4 / TNF-DCs, $p = 0,3$). IFN-DCs zeigten im Vergleich mit IL-4 / TNF-DCs jedoch eine stärkere Expression des Rezeptors und Ektoenzym CD38, das kürzlich als Marker für reife DCs beschrieben wurde [113] (22 ± 7 % für IFN-DCs vs. 11 ± 10 % für IL-4 / TNF-DCs, $p = 0,08$).





Desweiteren war der Anteil der für die kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD80 positiv markierten Zellen signifikant größer in den IFN-DC-Populationen als in den IL-4 / TNF-DC-Populationen (CD40: 14 ± 9 % für IFN-DCs vs. 4 ± 4 % für IL-4 / TNF-DCs, $p = 0,02$ und CD80: 49 ± 19 % vs. 22 ± 13 %, $p = 0,006$).

Zusammenfassend ergibt die immunphänotypische Analyse, dass IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs eine für DCs typische Expression von Zelloberflächenmolekülen zeigten. Dennoch werden Unterschiede deutlich. IFN-DCs zeigten eine stärkere Expression des plasmazytoiden DC-Markers CD123 sowie von Molekülen, die mit einem fortgeschritteneren Reifungszustand assoziiert sind, wie CD38, CD40 und CD80. Im Gegensatz dazu waren IL-4 / TNF-DCs positiv für den myeloiden DC-Marker CD209 und exprimierten den IgE-Rezeptor CD23, der mit dem unreifen Phänotyp phagozytierender DCs assoziiert ist.

3.1.4 Unterschiede in der Genexpression

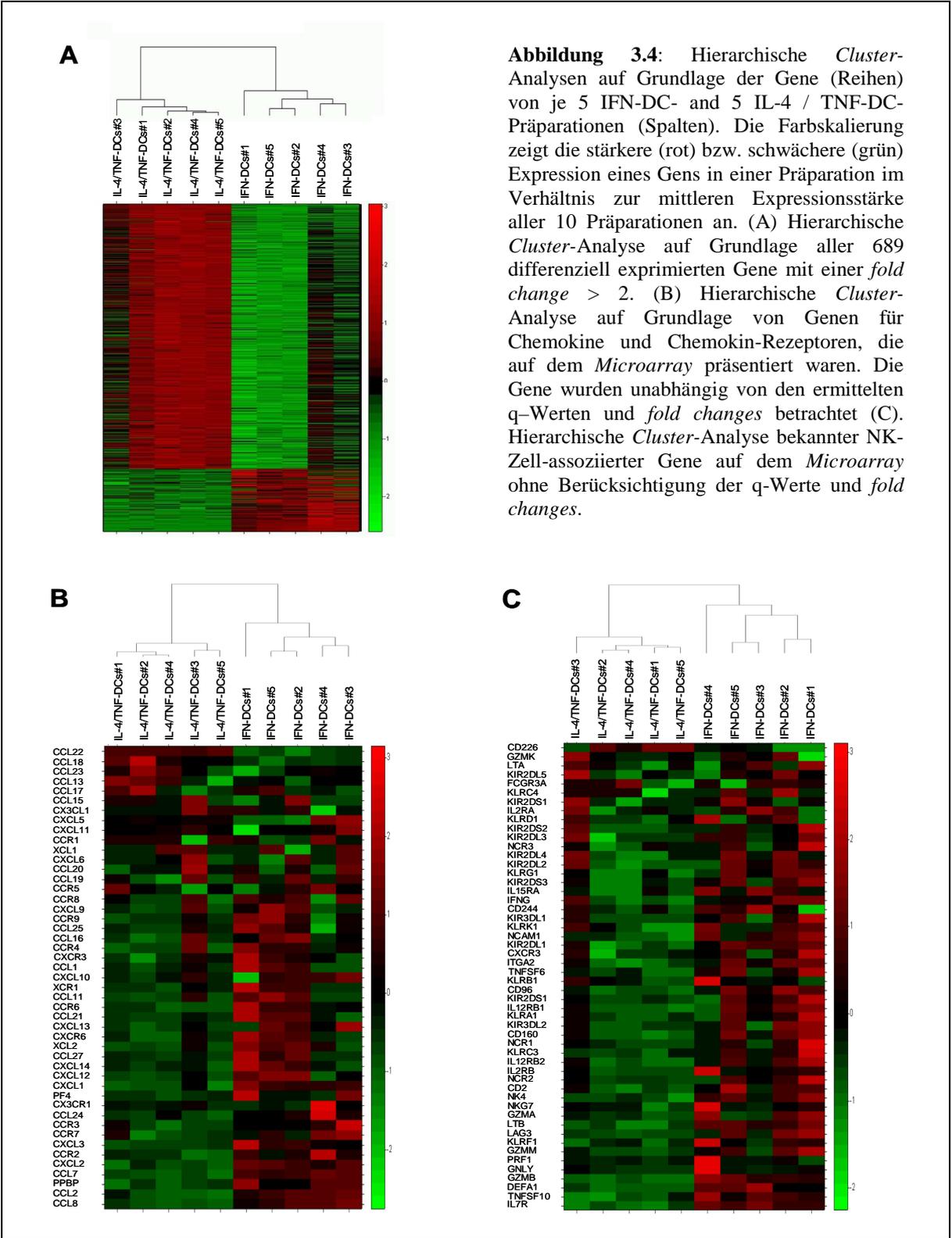
Es wurden Genexpressionsprofile von jeweils 5 DC-Präparationen für beide Kulturbedingungen erstellt und miteinander verglichen. Nach der Normalisierung der *Microarrays* wurden 4.375 Gene von insgesamt 8.793 *probe sets* gefunden, die in IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs mit einem q-Wert < 5 % signifikant unterschiedlich exprimiert waren. Die Expression von 689 dieser Gene unterschied sich mindestens um den Faktor 2. Von diesen 689 Genen zeigten 131 eine mehr als zweifach stärkere Expression und 558 eine mehr als zweifach niedrigere Expression in IFN-DCs im Vergleich zu IL-4 / TNF-DCs. Eine hierarchische *Cluster*-Analyse auf Grundlage dieser 689 Gene (**Abbildung 3.4A**) verdeutlicht die Unterschiede durch eine strenge Gruppierung der IFN-DCs gegenüber den IL-4 / TNF-DCs. In den nachfolgenden Abschnitten wird eine Auswahl von differenziell exprimierten Genen beschrieben, die unterschiedlichen funktionellen DC-Eigenschaften zugeordnet werden konnten (**Tabellen 6.2 bis 6.5** im Anhang).

3.1.4.1 Signalwege von IFN- α , IL-4 und TNF- α

Die Verwendung von IFN- α , IL-4 und TNF- α für die Kultivierung von IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs führte erwartungsgemäß zur Aktivierung intrazellulärer Zytokin-spezifischer Signalwege. In IFN-DCs waren die Gene typischer Transkriptionsfaktoren des IFN- α -vermittelten Signalweges wie STAT1, IRF7, ISGF3G und NMI stärker exprimiert als in IL-4 / TNF-DCs. Desweiteren zeigten IFN-DCs die stärkere Expression einer Vielzahl von Interferon-Antwort-Genen [114]. Viele dieser Gene kodieren für Proteine mit bekannter antiproliferativer und antiviraler Effektorfunktion wie PKR für die doppelsträngige RNA-abhängige Proteinkinase, das Myxovirus (Influenza Virus) Resistenz 1-Gen Mx1 und die Oligoadenylat-Synthetase-Gene OAS1, OAS2 und OAS3. Neben einigen Genen mit bislang unbekannter Funktion waren auch andere typische Interferon-stimulierte Gene, die mit speziellen DC-Funktionen assoziiert sind, in IFN-DCs stärker exprimiert. Auf diese wird in den folgenden Abschnitten näher eingegangen.

In gleicher Weise konnten höhere Expressionsstärken von Genen in IL-4 / TNF-DCs beobachtet werden, die an IL-4-spezifischen Antworten beteiligt sind [115]. Diese Gene sind beispielsweise in Änderungen des Lipidstoffwechsels, Chemotaxe, Adhäsion, Apoptose und Phagozytose involviert. Sie umfassen die Gene für die Arachidonat-15-Lipoxygenase (ALOX15), das Chemokin MDC, das C-Typ-Lektin CD209, den Transkriptionsfaktor bcl6 und den Fc ϵ -Rezeptor 2 (FCER2). Parallel zeigten auch typische TNF- α -induzierte Gene, die

an intrazellulären Signalkaskaden und transkriptioneller Regulation beteiligt sind [115,116], eine stärkere Expression in IL-4 / TNF-DCs. Zu diesen gehören z.B. die Gene für den Inhibitor des Kernfaktors κ B I κ B / NFKBIA, das TNF- α -induzierte Protein 3 (TNFAIP3) oder das *early growth response*-Gen EGR1.



3.1.4.2 Allgemeiner Stoffwechsel und Zellzyklus

Von allen 689 differenziell exprimierten Genen mit einer *fold change* > 2 sind 265 an allgemeinen Kohlenhydrat-, Lipid-, Aminosäure-, Nukleotid- oder anderen Stoffwechselwegen, ATP-Synthese und Proteinbiosynthese sowie der Zellzyklus-Regulation beteiligt. Darunter fanden sich beispielsweise 50 Gene für ribosomale Proteine. Die Funktionen von 50 weiteren differenziell exprimierten Genen sind unbekannt (Daten nicht gezeigt).

Von den genannten Stoffwechsel- und Zellzyklus-Genen waren 255 stärker in IL-4 / TNF-DCs exprimiert als Zeichen einer allgemein stärkeren Stoffwechselaktivität in IL-4 / TNF-DCs im Vergleich zu IFN-DCs.

3.1.4.3 Antigenaufnahme, -prozessierung und –präsentation

Die meisten differenziell exprimierten Gene, die an der Phagozytose beteiligt sind, zeigten höhere RNA-Niveaus in IL-4 / TNF-DCs, wie beispielsweise die Gene für den inhibitorischen IgG-Rezeptor FCGR1B, die IgA- und IgE-Rezeptoren FCAR und FCER2, die Komplement-Faktoren und -Rezeptoren C1QA, C3 und C1QR1 sowie das C-Typ-Lektin CD205. Interessanterweise zeigten IFN-DCs jedoch eine stärkere Expression des Gens FCGR1A für den aktivierenden Fc γ -Rezeptor 1a / CD64.

Es konnten keine Expressionsunterschiede von Genen für MHC-Moleküle und andere Antigen-präsentierende Moleküle beobachtet werden. Einige Gene für lysosomale Proteine, die an der Antigenprozessierung beteiligt sind, waren jedoch differenziell exprimiert. Von besonderem Interesse hierbei ist die stärkere Expression der RNA für das Lysosom-assoziierte Membranprotein DC-LAMP in IFN-DCs, das in reifen Lymphknoten-DCs hochreguliert ist [117]. Darüber hinaus hatten IFN-DCs größere Mengen der Transkripte für lysosomale Endopeptidasen wie die Cathepsine L und D (CTSL und CTSD). IL-4 / TNF-DCs wiesen dagegen höhere RNA-Niveaus verschiedener Hitzeschockproteine (HSPA9B / HSP70, HSPD1 / HSP60 und HSPH1 / HSP110) auf, die als molekulare Chaperone Antigene für die Präsentation auf Klasse I MHC-Molekülen binden können [118].

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass IL-4 / TNF-DCs eine stärkere Expression der Rezeptoren phagozytischer unreifer DCs aufwiesen, während IFN-DCs bereits Anzeichen reifer Lymphknoten-DCs zeigten.

3.1.4.4 Migration und Adhäsion

Starke Unterschiede zwischen IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs waren in der Expression von Genen zu beobachten, die das Migrations- und Adhäsionsverhalten der Zellen beeinflussen. Die **Abbildung 3.4B** zeigt zusammenfassend die hierarchische *Cluster*-Analyse auf Grundlage der auf dem *Microarray* präsentierten Gene für Chemokin-Rezeptoren und Chemokine (vgl. auch Kapitel 3.1.4.6), die unabhängig von den ermittelten q-Werten und *fold changes* die differenzielle Expression dieser Gene zwischen IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs verdeutlicht.

IFN-DCs zeigten eine stärkere Expression der Gene für den Chemokin-Rezeptor CCR7 und die Integrin- α 4-Kette (ITGA / VLA4). Beide Moleküle spielen eine zentrale Rolle in der Migration reifer DCs in die Lymphknoten [33,119]. Ausserdem hatten IFN-DCs auch größere RNA-Mengen des Chemokin-Rezeptors CCR2, der ebenfalls eine Rolle in der Migration von DCs in die Lymphknoten spielt [120]. Darüberhinaus zeigten IFN-DCs eine stärkere Genexpression der Matrix-Metalloprotease ADAM-ähnliches Decysin 1 (ADAMDEC1) sowie des Adhäsionsmoleküls Sialoadhäsins, die eine Rolle bei der Wechselwirkung reifer DCs mit der Matrix und den Zellen in den Keimzentren der Lymphknoten spielen [121,122]. Schließlich zeigten IFN-DCs höhere Expressions-*Level* einiger Zytokeratin-Gene wie KRT19, KRT14 und KRT13, die alle in lymphoidem Gewebe wie dem Thymus aktiv sind [123].

IL-4 / TNF-DCs exprimierten andererseits in stärkerem Maße Gene für Adhäsionsmoleküle epithelialer, entzündlicher Gewebe wie die Integrin- α E-Kette ITGAE [124] sowie die β 2-Integrin-assoziierten Moleküle CD18 / ITGB2, CD11b / ITGAM, CD11c / ITGAX und CD44. β 2-Integrine sind zudem in phagozytotische Prozesse involviert [125]. Auch Gene für Gewebe-umbildende Matrix-Metalloproteinasen wie MMP12 und ADAM9, die eine Rolle in der epithelialen Migration von Makrophagen und Langerhanszellen sowie in der Fusion von Monozyten spielen, waren höher in IL-4 / TNF-DCs exprimiert [126,127]. Im Einklang mit der stärkeren Expression von Genen, die für die epitheliale Adhäsion wichtig sind, exprimierten IL-4 / TNF-DCs mehr RNA für Proteine, die an der Aktinskelettbildung und -organisation beteiligt sind wie Actinin1 (ACTN1), das Aktinfilament-Capping-Protein (CAPZB) und andere Zytoskelett-assoziierte Proteine wie Vinkulin (VCN), das typisch für die Adhäsionsstrukturen unreifer DCs ist [31].

Während IFN-DCs eine stärkere Expression von Genen zeigten, die wichtig für die Migration reifer DCs in die Lymphknoten und für ihre Lokalisation in den Lymphknoten sind, zeigten IL-4 / TNF-DCs eine stärkere Expression von Genen, die mit der Adhäsion in peripheren, entzündlichen Geweben assoziiert sind.

3.1.4.5 Überlebenssignale und Aktivierungsstatus

IFN-DCs zeigten eine verstärkte Expression der antiapoptotischen Gene BCL2A1 und TOSO sowie des Gens für den IL-7-Rezeptor. Diese drei Gene vermitteln auch in T- und NK-Zellen Überlebenssignale in Anwesenheit proapoptotischer Faktoren während der Differenzierung dieser Zellen [128, 129]. IL-4 / TNF-DCs zeigten eine stärkere Expression der Gene für Metallothioneine wie MT1X, MT1H, MT2A und Peroxyredoxine wie PRDX2, PRDX3 und PRDX6, die eine zytoprotektive Funktion unter oxidativen Stressbedingungen haben [130].

Interessanterweise zeigten IL-4 / TNF-DCs andererseits auch eine stärkere Expression des Gens für die IL-10-Rezeptor- α -Kette. Der IL-10-Rezeptor transduziert das antiinflammatorische Signal von IL-10, das eine Aktivierung von DCs verhindern kann [131]. Ausserdem wurden in IL-4 / TNF-DCs größere RNA-Mengen des Makrophagen-Koloniestimulierenden Faktors (M-CSF) und seines Rezeptors detektiert, deren Wechselwirkung die Differenzierung von Makrophagen fördert [132].

IFN-DCs zeigten also eine stärkere Expression von Genen, die das Überleben reifer DCs in den Lymphknoten ermöglichen. IL-4 / TNF-DCs exprimierten dagegen Gene, die unter antiinflammatorischen Bedingungen zu einer Deaktivierung der DCs oder zur Differenzierung der DCs zu Makrophagen führen können.

3.1.4.6 Proinflammatorisches Potenzial

IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs zeigten auch eine differenzielle Expression von Chemokinen, Zytokinen und anderen proinflammatorischen Mediatoren. Die **Abbildung 3.4B** zeigt die hierarchische *Cluster*-Analyse auf Grundlage aller auf dem *Microarray* präsentierten Gene für Chemokine sowie Chemokin-Rezeptoren ohne Berücksichtigung der q-Werte und *fold changes* (vgl. Kapitel 3.1.4.4), die die differenzielle Expression dieser Gene zwischen IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs verdeutlicht.

IFN-DCs hatten stärkere Expressionsniveaus der Gene für die Chemokine MCP1 / CCL2, MCP2 / CCL8 und MCP3 / CCL7 sowie Eotaxin2 / CCL24, sehr potenter Attraktoren von Monozyten, DCs, Granulozyten, NK-Zellen und T-Zellen [133]. IFN-DCs zeigten auch eine stärkere Expression der Chemokine Mip-2 α / CXCL2, Mip-2 β / CXCL3 und PPBP / CXCL7, welche bevorzugt zytotoxische Effektorzellen des angeborenen Immunsystems anlocken [44,134]. Neben diesen chemotaktischen Mediatoren hatten IFN-DCs auch größere Mengen der RNA für verschiedene Zytokine, die eine Aktivierung von Leukozyten vermitteln. Zu ihnen gehören IFN- β und IL-4 sowie das ISG15-Genprodukt, das einerseits intrazellulär

durch die Interaktion mit verschiedenen Regulatorproteinen die Expression von IFN- β verstärkt, andererseits aber auch als Zytokin sezerniert werden kann. Auch das IL-1 β -konvertierende Enzym Caspase 1 (CASP1), welches die Freisetzung der bioaktiven Formen der Zytokine IL-1 β und IL-18 katalysiert, war stärker in IFN-DCs exprimiert. Die genannten Zytokine wirken gemeinsam in der Potenzierung der IFN- α -Antwort und tragen zur Aktivierung von NK-Zellen, B-Zellen und T-Zellen bei [85,135,136].

IL-4 / TNF-DCs exprimierten dagegen stärker die Gene für andere Chemokine, die besonders für die Mobilisierung aktivierter T-Zellen in entzündliche Gewebe verantwortlich sind, wie MDC, RANTES, und Mip-1 β [133,137]. IL-4 / TNF-DCs zeigten auch eine stärkere Expression von Genen für Enzyme des Lipidstoffwechsels, wie die Arachidonat-15-Lipoxygenase und die Arachidonat-5-Lipoxygenase (ALOX15 und ALOX5). Diese katalysieren die Synthese proinflammatorischer Leukotriene, die eine Rolle bei der Differenzierung von DCs spielen [138]. Auch die Gene einiger Koagulationsfaktoren wie Faktor XIII A1 (F13A1) waren stärker in IL-4 / TNF-DCs exprimiert.

IFN-DCs zeigten somit eine stärkere Genexpression vieler Chemokine und Zytokine, die ein breites Spektrum von Immunzellen, insbesondere angeborene zytotoxische Effektorzellen, anlocken und aktivieren. IL-4 / TNF-DCs zeigten dagegen eine höhere Expression von Chemokinen, die insbesondere aktivierte T-Zellen anlocken, sowie von Enzymen zur Herstellung proinflammatorischer Lipidmetaboliten.

3.1.4.7 Zytotoxizität

Die IFN-DCs wiesen mehrere höher exprimierte Gene auf, die für Proteine kodieren, welche in direkte zellvermittelte, zytotoxische Reaktionen involviert sind. Insbesondere zeigten IFN-DCs größere Mengen des Transkripts für TRAIL, ein membranständiges oder sezerniertes, zytotoxisches Effektormolekül der TNF-Superfamilie, das für die zytotoxische Wirkung von NK-Zellen mitverantwortlich ist [139]. Überraschenderweise waren die Gene für die Granzyme B und M (GZMB und GZMM), apoptose-induzierende Effektormoleküle, die bekanntermaßen von zytotoxischen Lymphozyten, insbesondere NK-Zellen, sezerniert werden [140], mehr als zweifach stärker in IFN-DCs exprimiert. Diese Ähnlichkeit von IFN-DCs mit NK-Zellen war bislang noch nicht beschrieben worden. Daher wurde im Folgenden überprüft, ob weitere Gene, die spezifisch für NK-Zellen sind, differenziell in IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs exprimiert waren. Auf dem *Microarray* wurden 52 Gene gefunden, die eng mit NK-Zell-Funktionen assoziiert sind. Dabei wurden insgesamt 33 inklusive der oben

genannten Gene identifiziert, die signifikante Expressionsunterschiede mit einem q-Wert < 5 % aufwiesen. Alle waren stärker in IFN-DCs exprimiert (**Tabelle 6.3** im Anhang). Hierzu zählen die Gene für weitere zytotoxische Effektormoleküle wie Granzym A (GZMA), Lymphotoxin B (LTB) und Fas Ligand (FasL) wie auch die Zelloberflächenantigene CD2, CD56 und CD96. Desweiteren fanden sich darunter die Gene für die Killerzell-Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren KIR3DL2, KIR2DS1, KIR2DL1 und KIR2DS3, zu denen die inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren gehören [9], sowie aktivierende NK-Zell-Rezeptoren [141] wie die Killerzell-Lektin-ähnlichen Rezeptoren KLRF1, KLRC1, KLRA1 und KLRK1 / NKG2D und die natürlichen Zytotoxizitäts-auslösenden Rezeptoren NCR1 und NCR2. Auch die Gene für Polypeptidketten der NK-Zell-assoziierten Zytokin-Rezeptoren für IL-7 und IL-2 [142] sowie IL-12 und IL-15 [143] (IL7R, IL2RB, IL12RB1, IL12RB2 und IL15RA) waren stärker in IFN-DCs exprimiert. Ferner war INDO, das Gen für die Indolamin-pyrrol-2,3-dioxygenase, die einerseits mit immunregulatorischen Effekten, andererseits aber auch mit dem zytotoxischen Potenzial von NK-Zellen assoziiert ist [144], stärker in IFN-DCs exprimiert. Die hierarchische *Cluster*-Analyse ohne Berücksichtigung der q-Werte und *fold changes* auf der Grundlage von 52 bekannten NK-Zell-assoziierten Genen, die auf dem *Microarray* präsentiert sind (**Abbildung 3.4B**), veranschaulicht die differenzielle Expression dieser Gene zwischen IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs.

In IL-4 / TNF-DCs waren dagegen drei Gene mit antimikrobieller Funktion höher exprimiert als in IFN-DCs. Hierzu gehört beispielsweise das Gen für das Cathelicidin antimikrobielle Protein CAMP.

Als Schlussfolgerung aus diesen Ergebnissen lässt sich sagen, dass die spezifische Expression einer Vielzahl von Genen in IFN-DCs, die eng mit NK-Zell-Funktionen assoziiert sind, eine neue Eigenschaft von IFN-DCs ist, die sich bei IL-4 / TNF-DCs nicht findet.

3.1.4.8 Myeloide und plasmazytoide DC-Marker

Schließlich wurden IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs auf die unterschiedliche Expression von myeloiden und plasmazytoiden DC-Markern untersucht (**Tabelle 6.4** im Anhang). Neben den oben bereits erwähnten Genen für die myeloiden DC-Oberflächenmoleküle CD11b, CD11c und CD209, war auch das Gen für das Ektoenzym Aminopeptidase N / CD13, das ein weiterer myeloider Zelloberflächenmarker ist, geringer in IFN-DCs exprimiert als in IL-4 / TNF-DCs. Zudem zeigten IFN-DCs auch eine schwächere Genexpression des Transkriptionsfaktors Id2, der die Differenzierung myeloider DCs fördert, die Differenzierung von plasmazytoiden DCs jedoch hemmt [145,146].

Wie oben beschrieben, zeigten IFN-DCs in der immunphänotypischen Analyse die Zelloberflächenexpression von CD123, einem Marker, der plasmazytoide DCs charakterisiert. Dieser Marker ist auch auf Granulozyten und Monozyten, jedoch nur in geringem Maße auf myeloiden DCs zu finden. Daher wurden die *Microarray*-Daten genauer auf Ähnlichkeiten von IFN-DCs mit plasmazytoiden DCs untersucht. Trotz vergleichsweise niedrigen *fold changes*, zeigten die *Microarray*-Daten eine signifikant stärkere Expression Lymphozyten-assoziiierter Gene, die verantwortlich für den lymphoiden Charakter von plasmazytoiden DCs sind [15]. Hierzu gehören die Gene für lymphoide Transkriptionsfaktoren Spi-B, EBF2, TCF7L / E2A und TBX21 / TBET, die Prä-B-Zell Gene IGLL1 und IGI sowie andere lymphoide Marker wie CD2 und CD7.

Zusammenfassend zeigten die Genexpressionsdaten, dass IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs eine Vielzahl von Genen differenziell exprimieren und jeweils einen charakteristischen molekularen Phänotyp aufweisen. Im Vergleich zu IL-4 / TNF-DCs zeigten IFN-DCs eine stärkere Expression vieler Gene, die sowohl eine direkte NK-Zell-ähnliche zytotoxische Aktivität als auch Funktionen reifer DCs vermitteln, wie die Mobilisierung und Aktivierung zytotoxischer Immunzellen und die Migration in die Lymphknoten. Zudem zeigten IFN-DCs molekulare Eigenschaften von plasmazytoiden DCs. IL-4 / TNF-DCs dagegen zeigten einen myeloiden DC-Charakter mit einer stärkeren Expression von Genen, die mit den Funktionen unreifer DCs assoziiert sind, wie die Antigenaufnahme und die Adhäsion in entzündlichen Geweben.

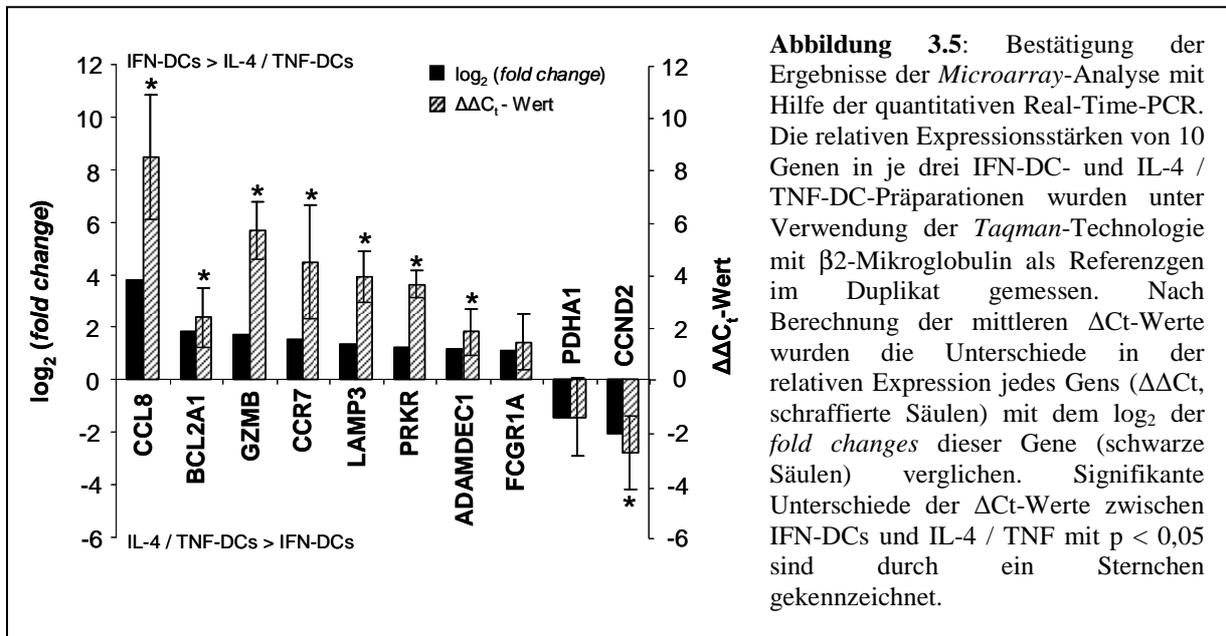
3.1.5 Bestätigung der *Microarray*-Daten

Die durch die *Microarray*-Analyse ermittelten differenziellen Unterschiede der Genexpression von IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs, wurden auf RNA-Ebene mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR und auf Protein-Ebene mit der Durchflusszytometrie verifiziert.

3.1.5.1 Quantitative Real-Time-PCR

Zur Bestätigung der *Microarray*-Daten wurde die differenzielle Expression der mRNA von 10 Genen in jeweils drei IFN-DC- und IL-4-DC-Präparationen mittels RQ-PCR bestimmt. Die 10 Gene, die stellvertretend für unterschiedliche funktionelle Gruppierungen ausgewählt worden waren, zeigten nach der *Microarray*-Analyse unterschiedliche *fold changes* zwischen 2 und 14. **Abbildung 3.5** zeigt den Vergleich der gemittelten $\Delta\Delta C_t$ -Werte der entsprechenden

Zielgene und des Referenzgens β 2-Mikroglobulin mit dem \log_2 der *fold changes*. Die differenzielle Expression aller 10 Gene konnte in sehr guter Übereinstimmung bestätigt werden.

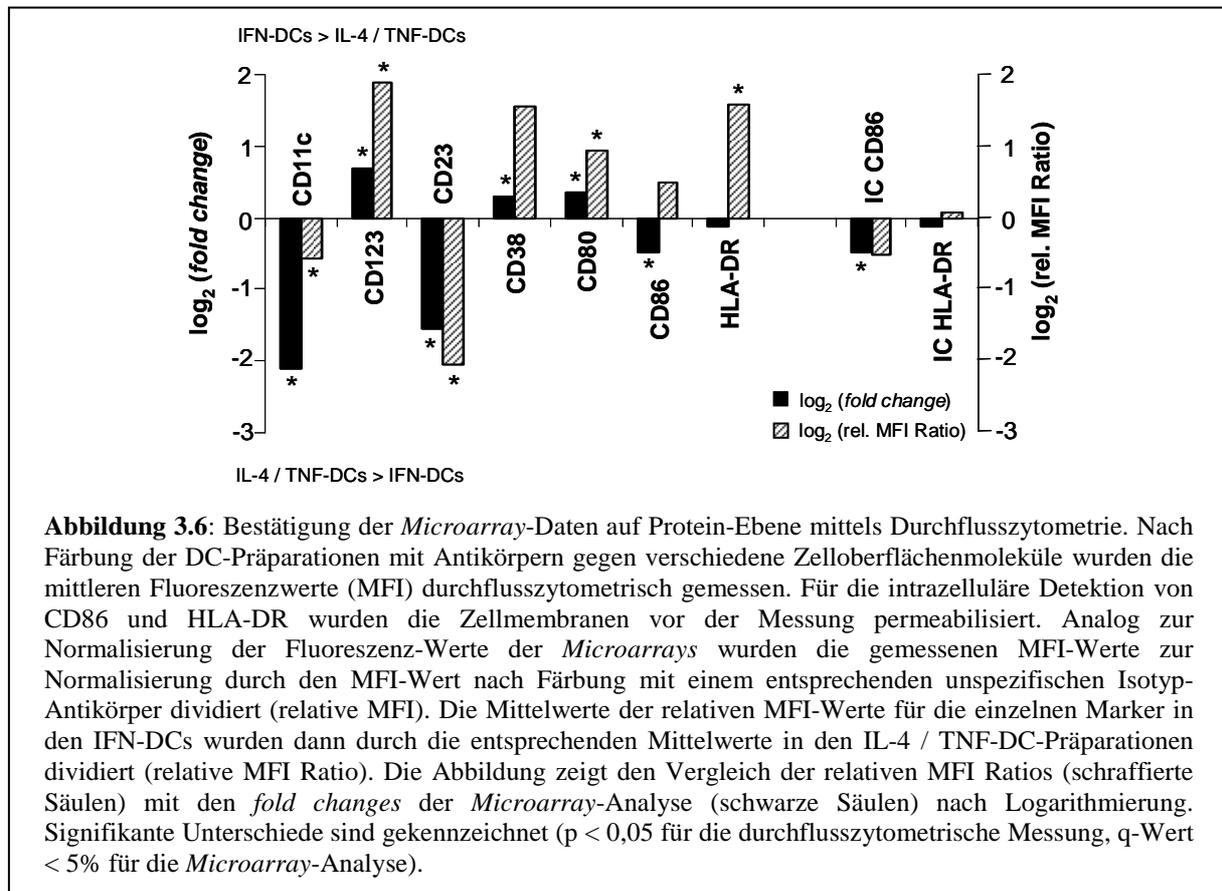


3.1.5.2 Vergleich der *Microarray*-Daten mit dem Immunphänotyp

Für den Vergleich der differentiellen Zelloberflächenexpression verschiedener Proteine wurden die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung der IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs mit den entsprechenden Daten aus der *Microarray*-Analyse verglichen (**Abbildung 3.6**).

Dabei zeigte sich eine gute Korrelation. Für zwei Marker, CD86 und HLA-DR, zeigte sich jedoch zunächst keine Korrelation. IFN-DCs zeigten größere Mengen beider Proteine auf der Zelloberfläche, obwohl sie geringere Mengen der RNA für CD86 bzw. gleich große RNA-Mengen für HLA-DR im Vergleich zu IL-4 / TNF-DCs aufwiesen. Dies ist dadurch zu erklären, dass mit Hilfe der durchflusszytometrischen Zelloberflächenanalyse Proteine, die intrazellulär vorliegen, nicht erfasst werden können. CD86 und HLA-DR akkumulieren in unreifen DCs intrazellulär in MIIC-Kompartimenten, bevor sie zur Zelloberfläche transportiert werden. Um zu überprüfen, ob IL-4 / TNF-DCs im Vergleich zu IFN-DCs größere Mengen der Proteine intrazellulär exprimieren, wurden die Zellmembranen vor der durchflusszytometrischen Testung zunächst permeabilisiert. Hierdurch wird die Gesamt-Proteinmenge auf der Zelloberfläche und intrazellulär erfasst. Der Vergleich der gemessenen

MFI-Werte von IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs für CD86 und HLA-DR korrelierte nach der Permeabilisierung in guter Übereinstimmung mit den *Microarray*-Daten.



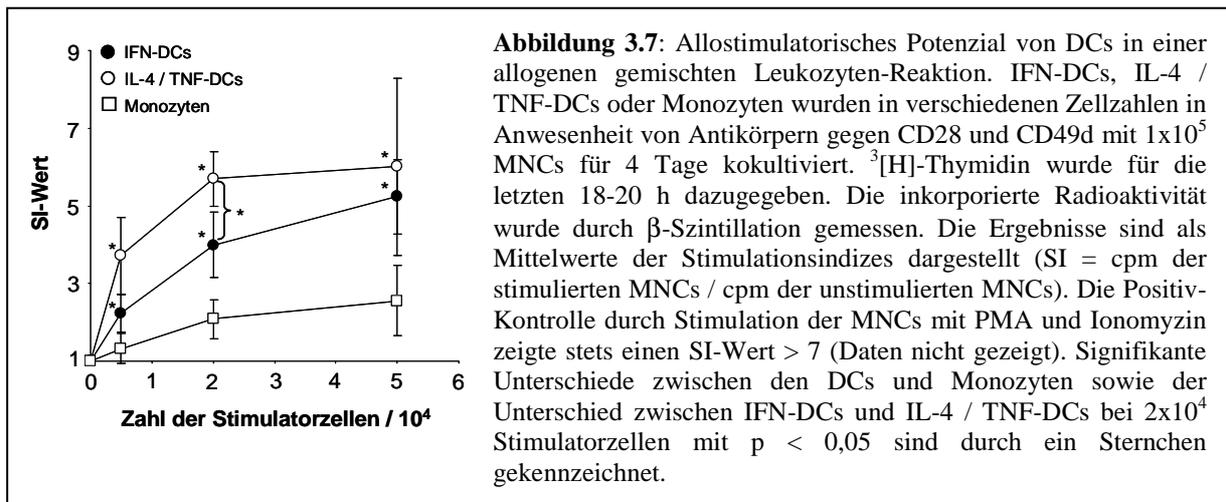
3.1.6 Funktionalität

Um die Relevanz der molekularen und phänotypischen Unterschiede zwischen IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs für die funktionellen Eigenschaften dieser DC-Populationen zu untersuchen, wurden verschiedene funktionelle Tests und vertiefende immunphänotypische Untersuchungen durchgeführt.

3.1.6.1 Allogene gemischte Leukozyten-Reaktion

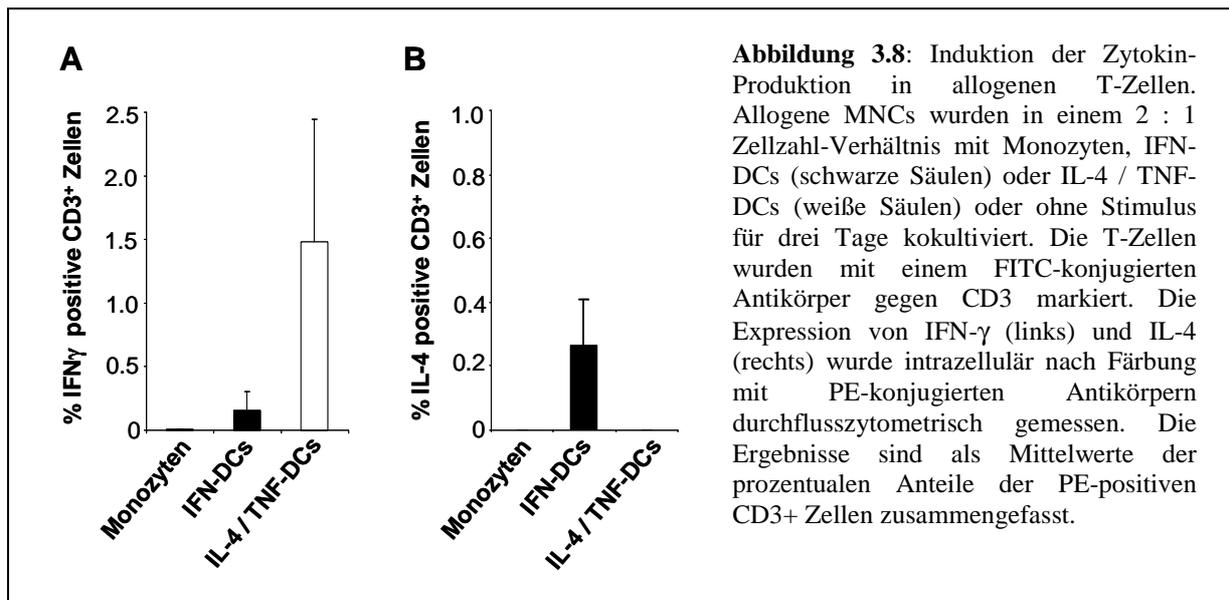
Zur Untersuchung des allostimulatorischen Potenzials der DCs wurde eine gemischte Leukozyten-Reaktion durchgeführt. Hierzu wurden 1×10^5 allogene MNCs mit verschiedenen Verdünnungen von Monozyten ($n = 5$), IFN-DCs ($n = 4$) oder IL-4 / TNF-DCs ($n = 4$) stimuliert und die SI-Werte gemessen. Wie in **Abbildung 3.7** zu sehen ist, konnten beide DC-Präparationen eine verstärkte Proliferation der MNCs induzieren. Das Ausmaß der

Proliferation war abhängig von der Konzentration der eingesetzten Stimulatorzellen. Obwohl die Einzelmesswerte relativ stark um die Mittelwerte streuten, konnten beide DC-Präparationen bei allen Stimulator- / Responderzellzahlverhältnissen signifikant höhere SI-Werte hervorrufen als Monozyten. Bei höheren DC-Zahlen war das allostimulatorische Potenzial der IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs ähnlich groß, während bei niedrigeren DC-Zahlen die IL-4 / TNF-DCs eine stärkere Proliferation der MNCs induzieren konnten als IFN-DCs.



3.1.6.2 Intrazelluläre Zytokin-Detektion in T-Zellen

IFN- γ und IL-4 sind typische Zytokine, die jeweils von T-Zellen des T_{H1} - bzw. T_{H2} -Typs sezerniert werden. Für die Untersuchung, ob IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs allogene T-Zellen zu einem T_{H1} - oder T_{H2} -Phänotyp polarisieren können, wurde die Expression von IFN- γ und IL-4 nach Kokultur in einer gemischten Leukozyten-Reaktion mittels intrazytoplasmatischer Immunfluoreszenz gemessen. Wie in **Abbildung 3.8** gezeigt, konnten im Gegensatz zu Monozyten ($n = 2$) sowohl IFN-DCs ($n = 3$) als auch IL-4 / TNF-DCs ($n = 3$) die IFN- γ -Produktion in allogenen $CD3^+$ T-Zellen induzieren ($0,005 \pm 0,005$ % für Monozyten vs. $0,15 \pm 0,15$ % für IFN-DCs vs. $1,48 \pm 0,97$ % für IL-4 / TNF-DCs). IL-4 / TNF-DCs waren die stärkeren IFN- γ -Stimulatoren als IFN-DCs. Andererseits konnten im Vergleich zu Monozyten und IL-4 / TNF-DCs nur IFN-DCs zusätzlich die Produktion von IL-4 in T-Zellen induzieren. Aufgrund der relativ starken Streuung der Einzelwerte und vergleichsweise kleinen Zahlen der getesteten Präparationen waren die Unterschiede jedoch nicht signifikant.

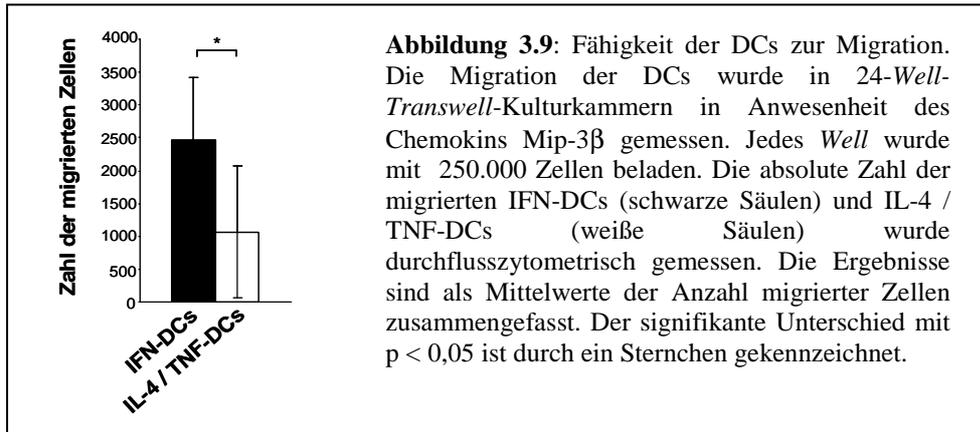


Ähnliche Ergebnisse wurden auch nach der separaten Untersuchung von CD4+ und CD8+ T-Zellen erzielt. Dabei war bei den CD8+ T-Zellen die Produktion von IFN- γ und IL-4 höher als bei den CD4+ T-Zellen (Daten nicht gezeigt).

Die Experimente zeigten, dass IL-4 / TNF-DCs eine starke T_H1-Immunantwort in allogenen T-Zellen induzieren, IFN-DCs dagegen eine weniger stark ausgeprägte, dafür aber ballancierte T_H1- und T_H2-Immunantwort auslösen.

3.1.6.3 Migration

Die Genexpressionsanalyse hat eine stärkere Expression verschiedener Migrations-assoziiierter Gene in IFN-DCs im Vergleich zu IL-4 / TNF-DCs gezeigt. Zur Untersuchung der migratorischen Fähigkeit der DCs wurde die Migration von IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs durch eine Fibronectin-beschichtete Filtermembran mit 8 μ m-Poren in einem *Transwell*-Kammer-System gemessen. Die **Abbildung 3.9** zeigt die Ergebnisse für jeweils 4 getestete IFN- und IL-4-DC-Präparationen in Anwesenheit des CCR7-Liganden CCL19. Im Mittel war der Anteil migrierter Zellen bei IFN-DCs signifikant um den Faktor 2,3 größer als bei IL-4 / TNF-DCs (2.473 ± 941 migrierte IFN-DCs vs. 1.067 ± 997 IL-4 / TNF-DCs, $p = 0,02$). In zwei IFN-DC-Präparationen war zudem eine Zunahme der Migration in Anwesenheit von CCL19 im Vergleich zu Kontrollansätzen ohne Chemokin zu vermerken (Daten nicht gezeigt). In den IL-4 / TNF-DC-Präparationen konnte dagegen keine CCL19-spezifische Migration beobachtet werden.

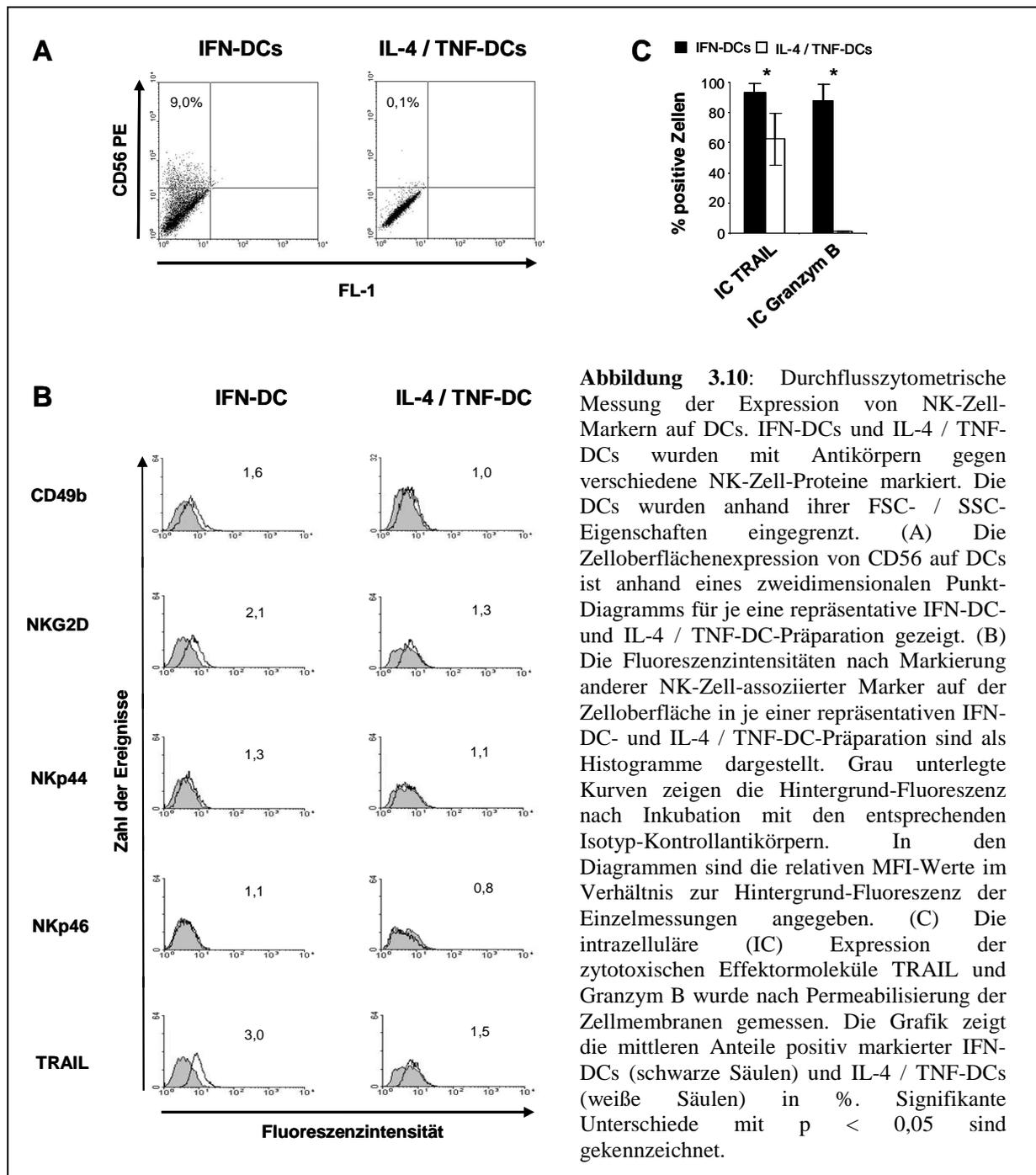


3.1.7 NK-Zell-Eigenschaften von IFN-DCs

IFN-DCs zeigten in der Genexpressionsanalyse gegenüber IL-4 / TNF-DCs eine verstärkte Expression der RNA für verschiedene NK-Zell-assoziierte Proteine. Zur Validierung dieser Ergebnisse wurden weitere durchflusszytometrische Messungen sowie die funktionelle Testung des zytotoxischen Potenzials der DCs durchgeführt.

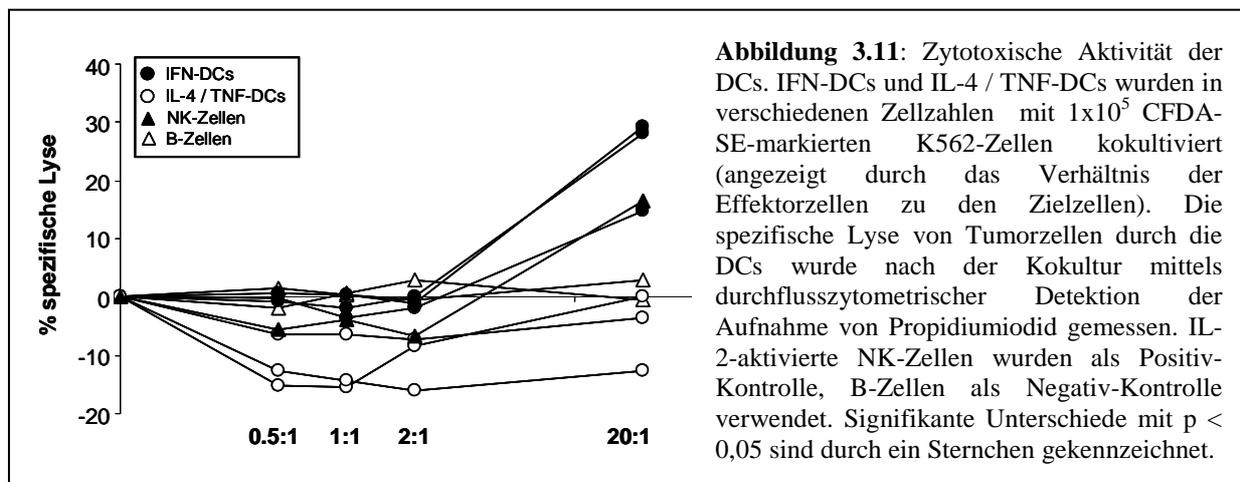
Interessanterweise zeigte sich in der immunphänotypischen Analyse für den NK-Zell-spezifischen Zelloberflächenmarker CD56, dass die Zunahme der CD56+ Zellen im „Gesamt-Gate“ der IFN-DC-Präparationen (vgl. Abschnitt 3.1) nur in geringem Maße durch die Zunahme von CD56+ Lymphozyten bedingt war. Die Expression von CD56 wurde stattdessen auf einem Anteil von 8 ± 5 % der IFN-DCs im „DC-Gate“ nachgewiesen (**Abbildung 3.10A**). IL-4 / TNF-DCs zeigten hingegen keine Expression von CD56 ($0,7 \pm 0,8$ %, $p < 0,001$). Bei der Untersuchung der Expression von CD16 / Fc γ -Rezeptor III, einem weiteren häufig verwendeten NK-Zell-Marker, der auch von Neutrophilen, Monozyten, Makrophagen und DCs exprimiert wird, zeigten sich keine Unterschiede zwischen IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs (im „Gesamt-Gate“: 11 ± 10 % für IFN-DCs und 12 ± 6 % für IL-4 TNF-DCs, $p = 0,9$; im „DC-Gate“: 7 ± 5 % für IFN-DCs und 8 ± 7 % für IL-4 / TNF-DCs, $p = 0,9$; Daten nicht gezeigt).

Die Färbung der Zellen mit Antikörpern gegen andere NK-Zell-assoziierte Zelloberflächenmarker (**Figure 3.10B**) zeigte eine Zunahme der relativen MFI-Werte für CD49b, NKG2D und insbesondere TRAIL auf IFN-DCs im Vergleich zu IL-4 / TNF-DCs, nicht jedoch von NKp44 und NKp46.



Darüberhinaus wurden die Zellen auf die intrazytoplasmatische Expression der typischen zytotoxischen Effektormoleküle TRAIL und Granzym B untersucht (**Abbildung 3.10C**). Ein intrazellulärer Pool von TRAIL wurde in fast allen IFN-DCs und in einem signifikant geringeren Anteil von IL-4 / TNF-DCs detektiert ($94 \pm 6 \%$ vs. $62 \pm 17 \%$, $p = 0,004$). Ausserdem konnte in $88 \pm 11 \%$ der IFN-DCs im Gegensatz zu IL-4 / TNF-DCs ($1,1 \pm 0,2 \%$, $p < 0,001$) die intrazelluläre Expression von Granzym B, das von NK-Zellen (und zytotoxischen T-Zellen) gebildet wird, nachgewiesen werden.

Neben dem Nachweis typischer NK-Zell-Oberflächenmarker und intrazellulärer Proteine gelang zudem der funktionelle Nachweis einer Zytotoxizität von IFN-DCs gegenüber K562-Zellen (**Abbildung 3.11**). Die IFN-DCs zeigten eine mittlere spezifische Lyse der K562-Zellen von 24 % nach 4 h Kokultur bei hohen Effektorzellzahlen. Bemerkenswerterweise war das zytotoxische Potenzial der IFN-DCs in diesem Assay vergleichbar groß wie das der Positiv-Kontrolle mit IL-2-aktivierten NK-Zellen. IL-4 / TNF-DCs zeigten hingegen keine lytische Aktivität gegenüber K562-Zellen (0 % spezifische Lyse, $p = 0,007$). Ebenso zeigten B-Zellen als Negativ-Kontrolle keine lytische Aktivität.



Zusammenfassend lässt sich sagen, dass IFN-DCs nicht nur eine stärkere Expression NK-Zell-assoziiierter Gene als IL-4 / TNF-DCs zeigten, sondern auch immunphänotypische und funktionelle Eigenschaften von NK-Zellen aufwiesen.

3.2 Vakzinierung von Patienten mit dendritischen Zellen und Patienten-spezifischem CDR3-Peptid

Im Rahmen eines individuellen Heilversuchs wurden zwei Patienten mit Multiplem Myelom mit DCs behandelt. Der eine Patient erhielt herkömmlich generierte IL-4 / TNF-DCs, der andere Patient wurde aufgrund ihrer neuen positiven Eigenschaften mit IFN-DCs behandelt.

3.2.1 Vergleich zweier Methoden zur Anreicherung von Monozyten: Adhärenz-Verfahren und Negativselektion

Für die klinische Anwendung müssen DCs in großem Maßstab unter reinen Bedingungen nach Maßgabe der *Good manufacturing practice* (GMP) hergestellt werden. Eine GMP-gerechte Negativselektion von Monozyten mit Hilfe von Antikörpern ist bislang nicht möglich. Die Verwendung von CD14-Antikörpern zur Positivselektion von Monozyten hat den Nachteil, dass diese Antikörper die Zellen möglicherweise verändern. Eine GMP-gerechte Methode zur Anreicherung von Monozyten ohne Verwendung von Antikörpern ist das Adhärenz-Verfahren. Um zu zeigen, dass die mit dieser Methode hergestellten DCs den DCs nach Negativselektion gleichen, wurden insgesamt 16 IFN-DC-Präparationen mit Hilfe des Adhärenz-Verfahrens hergestellt und immunphänotypisch sowie funktionell analysiert.

Die in der Kultur eingesetzten MNCs hatten einen niedrigeren mittleren Anteil von 15 ± 5 % CD14+ Monozyten als die durch Negativselektion angereicherten Monozyten ($p < 0,001$). Nach der Kultur lag die Ausbeute der geernteten Zellen im Median bei 6 ± 3 % der eingesetzten Zellen. Im Vergleich lag die Ausbeute der geernteten Zellen aus der negativ angereicherten Monozyten-Präparation, die einen Anteil von 71 ± 12 % CD14+ Zellen zeigte, bei 26 ± 13 % ($p < 0,001$; vgl. Abschnitt 3.1).

Die Reinheit der IFN-DCs, die mit dem Adhärenz-Verfahren gewonnen wurden, war ebenso signifikant geringer im Vergleich zur Kultur mit negativ selektionierten Monozyten (36 ± 15 % vs. 79 ± 16 % Zellen mit FSC- / SSC-Eigenschaften von DCs, $p < 0,001$). Im FSC- / SSC-Diagramm war eine große Lymphozytenpopulation zu erkennen (**Abbildung 3.12A**), die bei den negativ selektionierten Zellen nur angedeutet zu beobachten war. Bei der immunphänotypischen Reinheitsbestimmung über CD45+ Zellen fanden sich 23 ± 8 % CD3+ T-Zellen, 38 ± 16 % CD19+ B-Zellen und 4 ± 4 % CD56+ Zellen. Adhärenz-IFN-DCs zeigten eine mittlere Viabilität von 84 ± 12 % ($p = 0,1$).

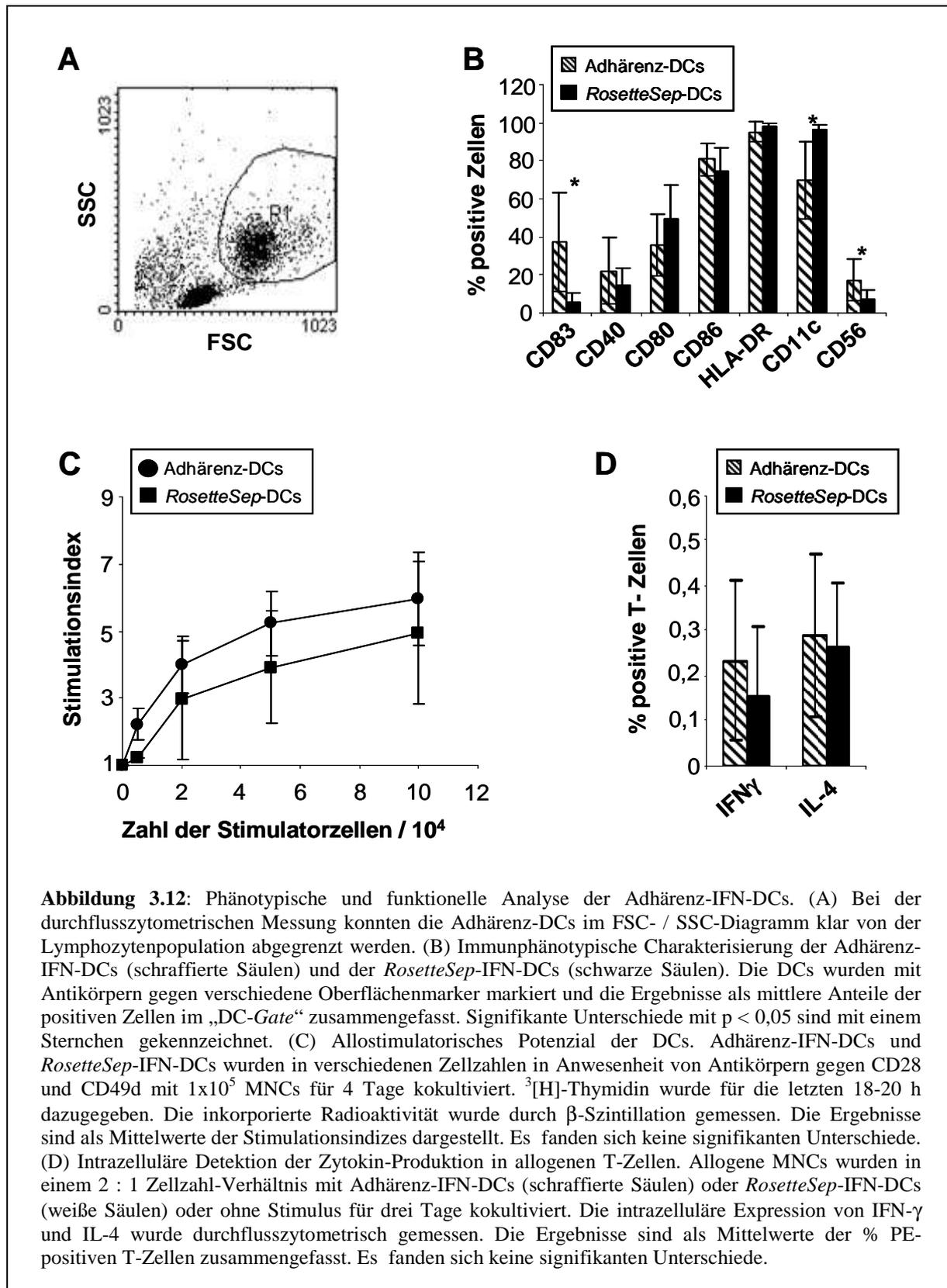


Abbildung 3.12: Phänotypische und funktionelle Analyse der Adhärenz-IFN-DCs. (A) Bei der durchflusszytometrischen Messung konnten die Adhärenz-DCs im FSC- / SSC-Diagramm klar von der Lymphozytenpopulation abgegrenzt werden. (B) Immunphänotypische Charakterisierung der Adhärenz-IFN-DCs (schraffierte Säulen) und der *RosetteSep*-IFN-DCs (schwarze Säulen). Die DCs wurden mit Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenmarker markiert und die Ergebnisse als mittlere Anteile der positiven Zellen im „DC-Gate“ zusammengefasst. Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ sind mit einem Sternchen gekennzeichnet. (C) Allostimulatorisches Potenzial der DCs. Adhärenz-IFN-DCs und *RosetteSep*-IFN-DCs wurden in verschiedenen Zellzahlen in Anwesenheit von Antikörpern gegen CD28 und CD49d mit 1×10^5 MNCs für 4 Tage kokultiviert. ³[H]-Thymidin wurde für die letzten 18-20 h dazugegeben. Die inkorporierte Radioaktivität wurde durch β -Szintillation gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte der Stimulationsindizes dargestellt. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede. (D) Intrazelluläre Detektion der Zytokin-Produktion in allogenen T-Zellen. Allogene MNCs wurden in einem 2 : 1 Zellzahl-Verhältnis mit Adhärenz-IFN-DCs (schraffierte Säulen) oder *RosetteSep*-IFN-DCs (weiße Säulen) oder ohne Stimulus für drei Tage kokultiviert. Die intrazelluläre Expression von IFN- γ und IL-4 wurde durchflusszytometrisch gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte der % PE-positiven T-Zellen zusammengefasst. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

Die immunphänotypische Analyse der Adhärenz-DCs im „DC-Gate“ zeigte ein ähnliches Ergebnis wie die Analyse der IFN-DCs aus negativ selektionierten Monozyten (**Abbildung**

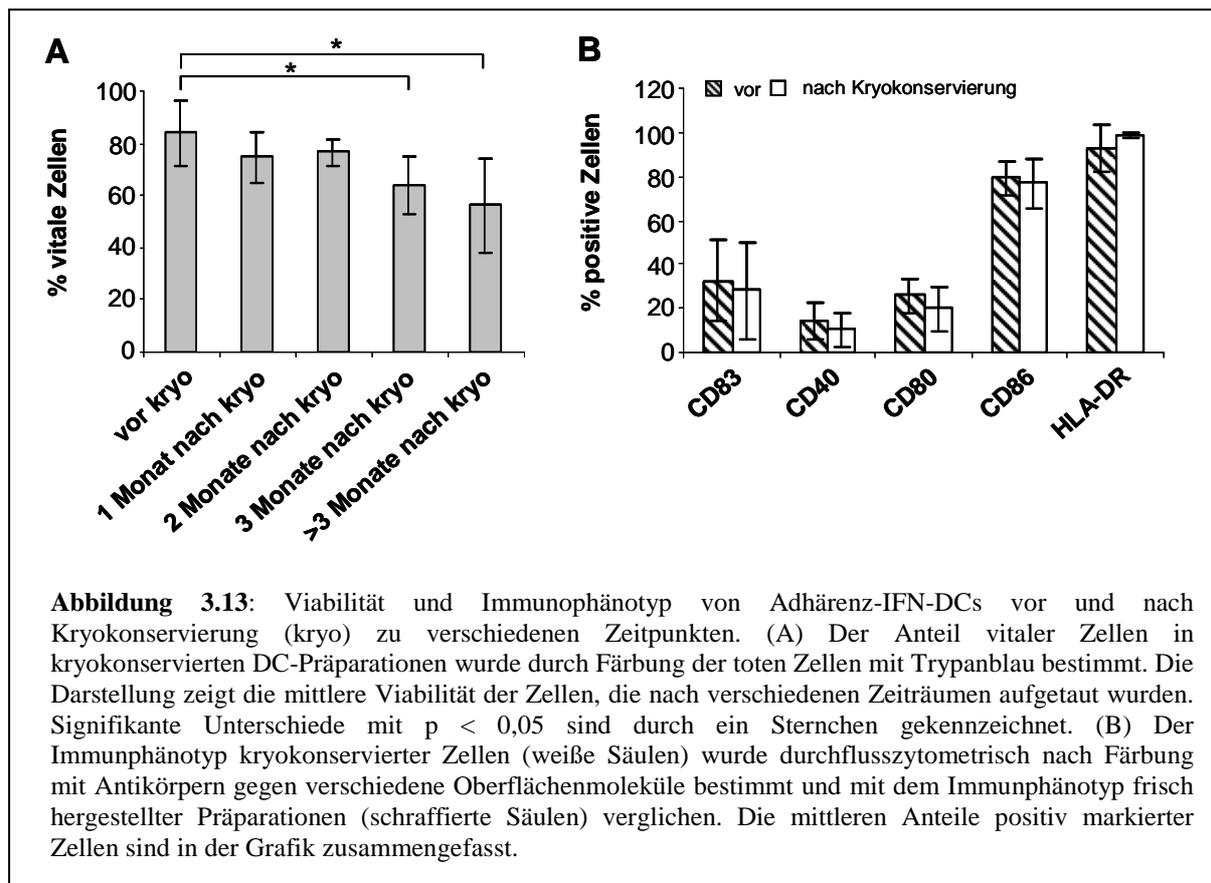
3.12B). DC-Marker wie die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 sowie HLA-DR wurden auf einem gleich großen Anteil der DCs detektiert. Der myeloide Marker CD11c war jedoch mit 70 ± 20 % auf einem signifikant geringeren Anteil der Adhärenz-IFN-DCs exprimiert ($p = 0,002$). Interessanterweise zeigten die Adhärenz-DCs im Vergleich zu den IFN-DCs nach *RosetteSep*-Anreicherung einen signifikant höheren Anteil des Reifemarkers CD83 von 37 ± 26 % (vs. 5 ± 5 %, $p = 0,004$). Ebenso konnte auch CD56 auf den Adhärenz-IFN-DCs nachgewiesen werden. Dieser NK-Zell-Marker war mit 17 ± 11 % (im Vergleich zu 4 ± 4 % im „Gesamt-Gate“, vgl. oben) sogar auf einem signifikant größeren Anteil der Adhärenz-IFN-DCs exprimiert als bei den *RosetteSep*-DCs (8 ± 5 %, $p = 0,01$).

Mit Blick auf das allostimulatorische Potenzial zeigten die Adhärenz-IFN-DCs ($n = 9$) keine signifikanten Unterschiede zu den *RosetteSep*-DCs ($n = 4$) in der allogenen MLR (**Abbildung 3.12C**). In gleicher Weise zeigten die Adhärenz-IFN-DCs ($n = 4$) ein ähnliches Potenzial zur Stimulation von IFN- γ und IL-4 in allogenen T-Zellen wie *RosetteSep*-IFN-DCs ($n = 3$) (**Abbildung 3.12D**).

3.2.2 Vergleich von frischen und kryokonservierten dendritischen Zellen

Für die klinische Anwendung ist es notwendig, eine DC-Präparation für mehrere Vakzinierungszeitpunkte zu konservieren. Daher wurde überprüft, welchen Einfluss die Kryokonservierung auf den Phänotyp der IFN-DCs hat. Dazu wurden verschiedene IFN-DC-Präparationen, die mit dem Adhärenz-Verfahren gewonnen worden waren, nach einer Kryokonservierung untersucht. Die Viabilität der Zellen war nach dem Auftauen innerhalb der ersten zwei Monate nach dem Einfrieren vergleichbar groß wie zum Zeitpunkt der Ernte der Zellen (**Abbildung 3.13A**). Nach einer längeren Lagerung bei -80 °C zeigten die Messungen zwischen zwei und drei Monaten und bis 9 Monate nach dem Einfrieren eine signifikante Abnahme der Viabilität.

Der Immunphänotyp von 4 kryokonservierten DC-Präparationen wurde nach dem erneuten Auftauen ein, zwei und drei Wochen sowie zwei Monate nach dem Einfrieren analysiert. Keine signifikanten Unterschiede wurden im Vergleich mit dem Immunphänotyp der frisch geernteten DCs beobachtet (**Abbildung 3.13B**). Der Immunphänotyp zu einem späteren Zeitpunkt wurde nur anhand einer Präparation 5 Monate nach Kryokonservierung sowie bei drei Präparationen nach mehr als einem Jahr Kryokonservierung untersucht. Insgesamt konnte dabei ebenfalls keine signifikante Veränderung des Immunphänotyps beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).



3.2.3 Generierung von dendritischen Zellen, die mit CDR3-Peptid beladen wurden und Vakzinierung von Patienten mit Multiplem Myelom

Zwei Patienten mit Multiplem Myelom wurden im Rahmen eines individuellen Heilversuchs an der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Zustimmung der lokalen Ethikkommission und der Patienten mit CDR3-Peptid-beladenen DCs behandelt. Für beide Patienten wurden die Tumor-spezifischen Nukleotidsequenzen der CDR3-Region ermittelt. Das Patienten-spezifische CDR3-Peptid wurde dann anhand der entschlüsselten Gensequenz von der Firma SeqLab hergestellt (Tabelle 3.1). Die DCs wurden unter GMP-Bedingungen mit Hilfe des Adhärenz-Verfahrens aus frisch gewonnenen Apheresaten hergestellt und 1 h lang bei 37 °C mit 100 µg / ml CDR3-Peptid beladen. Dabei wurden bei einem Patienten IL-4 / TNF-DCs und bei dem anderen Patienten IFN-DCs verwendet. Sodann wurden 1×10^7 DCs subkutan verabreicht und der Rest eingefroren. Weitere Vakzinierungen mit derselben Zellzahl folgten im Abstand von je einem Monat. Danach wurden 4 subkutane *Booster*-Vakzinierungen mit CDR3-Peptid, das an KLH gebunden war, durchgeführt.

3.2.4 Serologisches und molekulares Monitoring der vakzinierten Patienten

In beiden Fällen konnte eine gute Verträglichkeit der Vakzine mit nur milden lokalen Reaktionen als Nebenwirkungen festgestellt werden. Neben dem klinischen Ansprechen wurde auf molekularer Ebene die Zahl der Tumorzellen im peripheren Blut bestimmt. Dafür wurde eine Patienten-spezifische quantitative Real-Time-PCR für den IgH-Lokus beider Patienten etabliert. Dabei kamen je eine CDR3-spezifische Sonde, ein spezifischer Vorwärts-Primer mit Bindungsstelle in der CDR3-Region für Patient 1 bzw. in der CDR2-Region für Patient 2 sowie ein Konsens-Rückwärts-Primer für Patient 1 bzw. ein CDR3-spezifischer Rückwärts-Primer für Patient 2 zum Einsatz (**Tabelle 3.1**, vgl. auch **Abbildung 1.2**). Für die PCR-Reaktion beider Patienten wurden die in **Tabelle 3.2** zusammengefassten optimalen *Annealing*-Temperaturen und MgCl₂-Konzentrationen verwendet und die im Material und Methoden-Kapitel angegebenen Qualitätskriterien für die IgH-PCR erreicht.

Idiotyp-spezifische T-Zellen im peripheren Blut konnten in einem immunologischen Test mit synthetischen CDR3-Nonapeptid-beladenen Klasse I MHC-Tetrameren bei beiden Patienten nicht nachgewiesen werden. Dies ist im Wesentlichen auf die mangelnde Viabilität der aufgetauten MNCs der Patienten zurückzuführen, die nach der Vakzinierung für nachfolgende Untersuchungen gewonnen und bei -80 °C kryokonserviert worden waren. Spezifische T-Zellen konnten unter diesen Bedingungen nicht ausreichend expandiert werden, so dass die Sensitivität des Assays nicht ausreichte, um diese Zellen zu detektieren. Ein immunologisches Ansprechen auf die Therapie konnte daher nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 3.1: Ermittelte Nukleotid- und Peptidsequenzen der Tumor-spezifischen CDR3-Regionen von zwei Patienten mit Multiplem Myelom. Die Keimbahnsequenzen der V _H - , D- und J _H -Gensegmente sind unter Anwendung der <i>IgBlast</i> Software (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/) ermittelt worden. Nukleotide der CDR2- und CDR3-Region sind fett gedruckt, Abweichungen von der Keimbahnsequenz inklusive CDR3-Region sind unterstrichen. Die Kodons für die Herstellung des CDR3-Peptids sind kursiv gedruckt. Die Bindungsstellen der ASO- <i>Taqman</i> -Sonden sind grün und die der ASO-Primer blau gekennzeichnet. Für Patient 1 wurde der Konsens-Primer JH1245 als Reverse-Primer verwendet.		
Patient 1 HLA-A02	CDR3- Nukleotidsequenz	5' - CG GCY STG TAT TAT <u>TAC TGT GCG CGA -</u> <u>GAT TGG GGC ATT GTA GTA GAC CCA GTT GCG</u> CCC GAC TTT - TGG GGC CAG GGA GCC CT - 3' + JH1245
	CDR3- Peptidsequenz	H ₂ N - CARDWGI V VDPVAPDFWQGA - COOH
Patient 2 HLA-A02	CDR3- Nukleotidsequenz	5' - TGG ATC CGC CAG GCT CCA GGG AGG GGG CTG GAG <u>TGG GTT TCA -</u> <u>TAC ATT GCT ACT AGT ACG</u> AGT <u>TAC ACA AAG</u> TAC GCA GAC TCT GTG AAG GGC- CGA TTC ACC ATC TCC <u>GGA</u> GAC AAC GCC AAG AGC TCA CT ₁ TTT CTG CAA ATG <u>AGC</u> AGC CTG AGA GCC GAA <u>GAC</u> ACG GCC <u>GTC</u> TAT TAC TG <u>TGCG AGG -</u> <u>GGA TAC ACC TAT GGT CA</u> <u>GGC AAT CTG TTC -</u> <u>TGG GGC CAG G</u> GA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA GGT - 3'
	CDR3- Peptidsequenz	H ₂ N - CARGYTYGPNLFWQGTL - COOH

Tabelle 3.2: Etablierung der Patienten-spezifischen IgH-PCR. Es wurden jeweils drei verschiedene PCRs wie in Kapitel 2.3.2.3.2.2 beschrieben durchgeführt und die optimale MgCl₂ und Annealing-Temperatur für Primer und Sonden, die Sensitivität und Spezifität der Patienten-spezifischen IgH-PCRs ermittelt.

	Temperatur	MgCl ₂ - Konzentration	Steigung	Sensitivität		Spezifität
				maximal	linear	
Patient 1	60 °C	6mM	3,31 ± 0,43	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	ja
Patient 2	63 °C	7mM	3,28 ± 0,17	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	ja

3.2.4.1 Patient 1

Patient 1 erreichte nach einer ersten Hochdosis-Chemotherapie und nachfolgender autologer Blutstammzelltransplantation im Rahmen der Primärtherapie nur eine *minimal response* [147] und wurde daher mit IL-4 / TNF-DCs behandelt. Nach Beginn der Vakzinierungstherapie mit 4 DC- und 4 *Booster*-Vakzinierungen blieb der Patient für 39 Monate in Remission bis er ein erneutes Rezidiv entwickelte (**Abbildung 3.14 oben**).

Die Konzentration des Paraproteins zeigte nach der Vakzinierungstherapie keine signifikanten Änderungen. Mit Hilfe der IgH-PCR konnten vor und während der Vakzinierungstherapie noch Tumorzellen im peripheren Blut des Patienten detektiert werden. Nach der zweiten *Booster*-Injektion wurden dann über einen Zeitraum von 7 Monaten molekularbiologisch keine Tumorzellen mehr im Blut detektiert. Etwa zwei Jahre vor der Diagnose des neuen Rezidivs waren die Tumorzellen wieder kontinuierlich nachweisbar. In Knochenmarkproben waren die Tumorzellen während des Vakzinierungs-Zeitraums kontinuierlich messbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich Patient 1 nach der Primärtherapie mit IL-4 / DCs zwei Jahre in stabiler Remission befand, obwohl er nur ein minimales klinisches Ansprechen auf eine Hochdosis-Chemotherapie erreichte. Der Patient lebt noch und spricht auf weitere Therapien an.

3.2.4.2 Patient 2

Patient 2 erhielt im beginnenden dritten Rezidiv nach zweimaliger Hochdosis-Chemotherapie und autologer Blutstammzelltransplantation 4 Injektionen mit IFN-DCs und 4 *Booster*-Injektionen als alleinige Therapie. Die Paraproteinkonzentration zeigte einen kurzfristigen Rückgang nach Beginn der Vakzinierung (**Abbildung 3.14 unten**). Dann konnte ein kontinuierlicher, langsamer Anstieg des Paraproteins beobachtet werden. Nach 11 Monaten

musste der Patient erneut mit Chemotherapie behandelt werden. Molekularbiologisch zeigte sich dieser Verlauf auch in der IgH-PCR mit peripheren Blutproben.

Die Vakzinierung von Patient 2, der bereits mehrere Therapien erfahren hatte, konnte einen beginnenden Progress nicht aufhalten. Trotz weiterer Therapien starb der Patient drei Jahre nach Beginn der Vakzinierungstherapie.

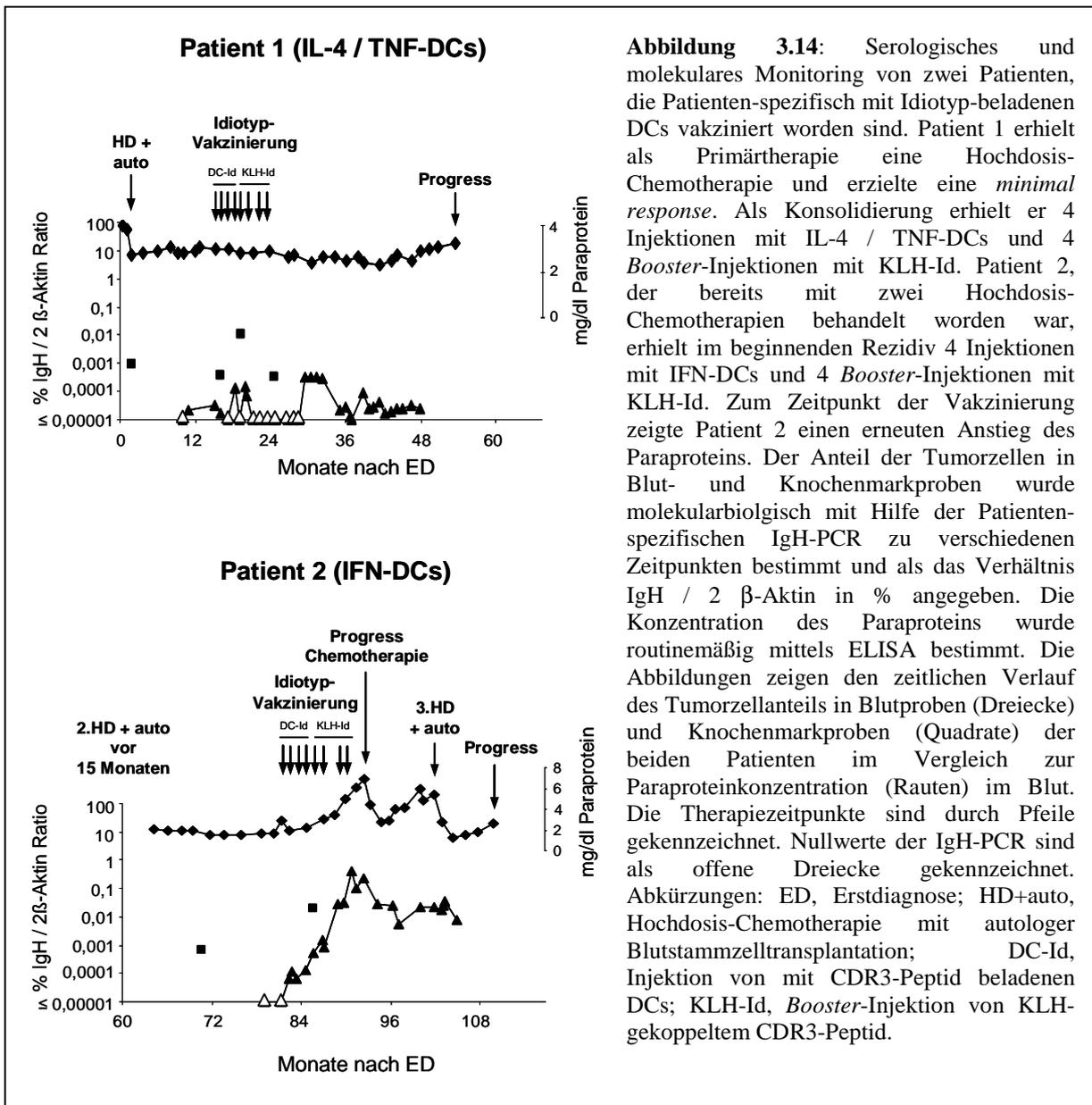


Abbildung 3.14: Serologisches und molekulares Monitoring von zwei Patienten, die Patienten-spezifisch mit Idiotyp-beladenen DCs vakziniert worden sind. Patient 1 erhielt als Primärtherapie eine Hochdosis-Chemotherapie und erzielte eine *minimal response*. Als Konsolidierung erhielt er 4 Injektionen mit IL-4 / TNF-DCs und 4 *Booster*-Injektionen mit KLH-Id. Patient 2, der bereits mit zwei Hochdosis-Chemotherapien behandelt worden war, erhielt im beginnenden Rezidiv 4 Injektionen mit IFN-DCs und 4 *Booster*-Injektionen mit KLH-Id. Zum Zeitpunkt der Vakzinierung zeigte Patient 2 einen erneuten Anstieg des Paraproteins. Der Anteil der Tumorzellen in Blut- und Knochenmarkproben wurde molekularbiologisch mit Hilfe der Patienten-spezifischen IgH-PCR zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt und als das Verhältnis IgH / 2 β-Aktin in % angegeben. Die Konzentration des Paraproteins wurde routinemäßig mittels ELISA bestimmt. Die Abbildungen zeigen den zeitlichen Verlauf des Tumorzellanteils in Blutproben (Dreiecke) und Knochenmarkproben (Quadrate) der beiden Patienten im Vergleich zur Paraproteinkonzentration (Rauten) im Blut. Die Therapiezeitpunkte sind durch Pfeile gekennzeichnet. Nullwerte der IgH-PCR sind als offene Dreiecke gekennzeichnet. Abkürzungen: ED, Erstdiagnose; HD+auto, Hochdosis-Chemotherapie mit autologer Blutstammzelltransplantation; DC-Id, Injektion von mit CDR3-Peptid beladenen DCs; KLH-Id, *Booster*-Injektion von KLH-gekoppeltem CDR3-Peptid.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Verabreichung von DCs gut vertragen wurde und nur milde lokale Nebenreaktionen verursachte. Die klinische Wirksamkeit von IFN-DCs im Vergleich zu IL-4 / TNF-DCs kann jedoch aufgrund der geringen Patientenzahl und der unterschiedlichen klinischen und Therapieverläufe der untersuchten Patienten nicht

abgeschätzt werden. Der Krankheitsverlauf kann anhand des molekularbiologischen Nachweises von Tumorzellen mit Hilfe einer Patienten-spezifischen Real-Time-PCR gut verfolgt werden.

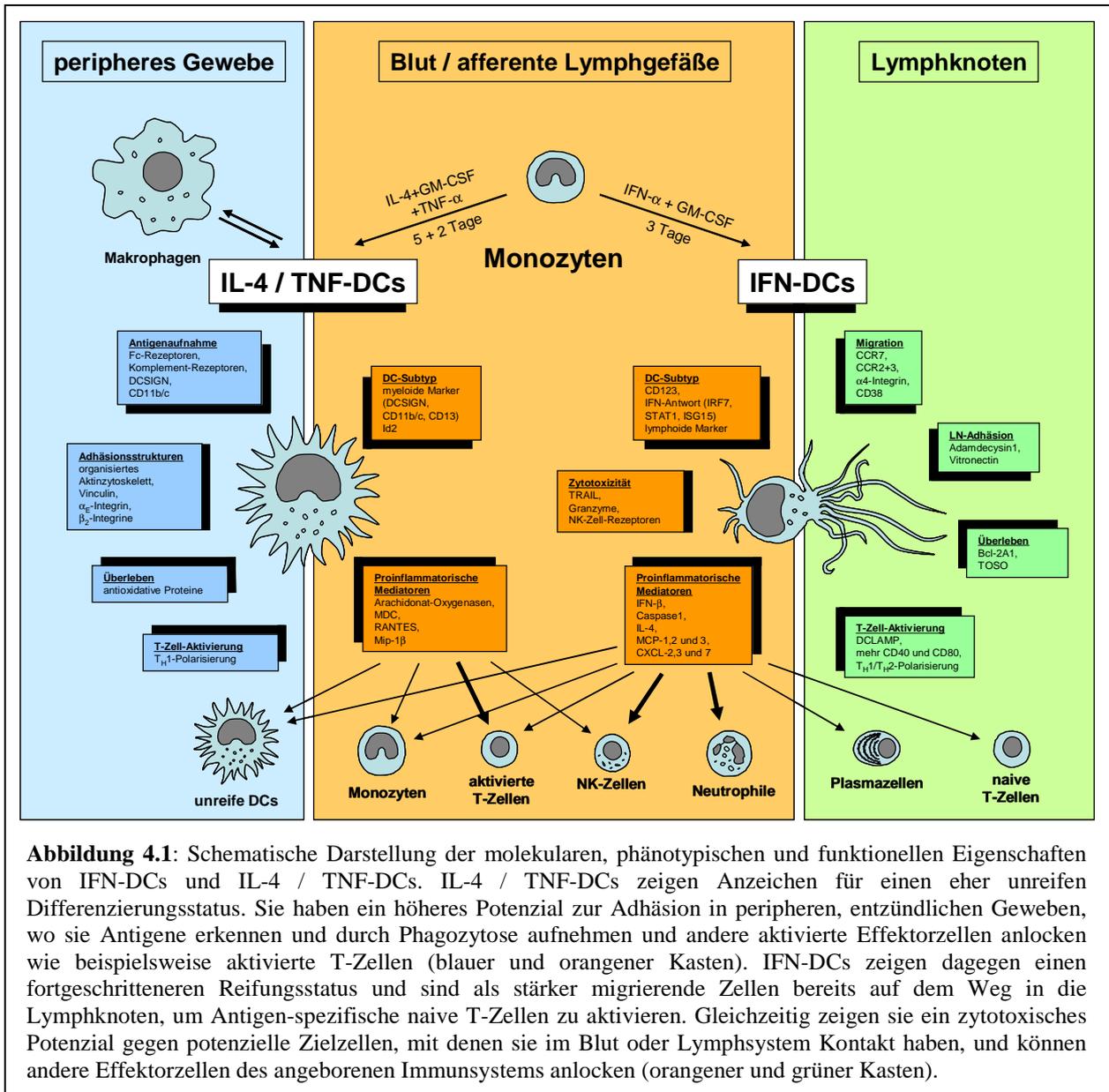
4 Diskussion

Die Entwicklung des Pocken-Impfstoffes im Jahr 1796 durch den Arzt Edward Jenner [148] war der Beginn der Immunologie als wissenschaftliche Disziplin. Die Ausrottung der Pocken und weitere Erfolge mit Impfstoffen gegen andere Infektionskrankheiten gehören zu den größten Errungenschaften der biomedizinischen Technik. Bahnbrechende Ergebnisse konnten in jüngster Zeit in der Prävention von Tumorerkrankungen erzielt werden. So konnte gezeigt werden, dass die Entstehung von anogenitalen Tumoren durch die Impfung mit Peptiden von menschlichen Papilloma-Viren (HPV), die für die Entstehung dieser Tumoren notwendig sind, verhindert werden kann [149]. In der Bekämpfung von bestehenden Tumoren konnten bislang jedoch nur geringe Erfolge erzielt werden [150]. Die Entwicklung neuer effizienter Impfstoffe ist daher Gegenstand intensiver Forschung. Von besonderer Bedeutung ist dabei die Entdeckung, dass DCs eine primäre Antigen-spezifische Immunantwort auslösen und aufrechterhalten können. DC-basierte Impfstoffe für Patienten mit Krebserkrankungen können daher helfen, die Impferfolge weiter zu verbessern.

Es ist jedoch ungeklärt, welches Protokoll sich am besten für die Generierung von DCs eignet, um eine effektive Immunantwort gegen Tumorantigene auszulösen [38]. Auf der Suche nach einem alternativen Weg zur Generierung von DCs wurden in dieser Arbeit die molekularen, phänotypischen und funktionellen Eigenschaften von IFN-DCs im Vergleich zu herkömmlich generierten mit TNF- α behandelten IL-4-DCs untersucht. Hierbei konnte dargelegt werden, dass sowohl IFN-DCs als auch IL-4 / TNF-DCs typische DC-Eigenschaften präsentieren. Dennoch wiesen beide DC-Populationen einen individuellen molekularen und funktionellen Phänotyp auf (**Abbildung 4.1**). Der auffälligste Unterschied lag darin, dass IFN-DCs im Vergleich zu IL-4 / TNF-DCs Eigenschaften plasmazytoider DCs besaßen und gleichzeitig eine gesteigerte Expression von NK-Zell-assoziierten Genen sowie eine direkte zytotoxische Wirkung gegen Tumorzellen zeigten. Der zweite wichtige Unterschied war, dass IFN-DCs verglichen mit IL-4 / TNF-DCs Anzeichen für einen fortgeschrittenen Reifungs- und Aktivierungsgrad aufwiesen und eine größere Kapazität zur Migration in die Lymphknoten hatten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen daher nahe, dass IFN-DCs nicht nur in der Lage sind, eine erworbene spezifische Immunantwort in den Lymphknoten zu induzieren, sondern darüberhinaus auch eine angeborene Anti-Tumor-Antwort vermitteln können. IL-4 / TNF-DCs zeigten dagegen einen eher myeloiden DC-Phänotyp mit einem größeren Potenzial zur Antigenaufnahme und Adhäsion in peripheren Geweben. Diese Eigenschaften weisen auf eine Beteiligung der IL-4 / TNF-DCs an einer eher lokalen Immunantwort hin.

IFN-DCs zeigen aufgrund ihrer neuen Eigenschaften gegenüber IL-4 / TNF-DCs möglicherweise eine verbesserte Wirksamkeit als Zell-basierter Impfstoff in der Bekämpfung von Tumorzellen und sollten daher in klinischen Studien getestet werden.



4.1 Mit GM-CSF und IFN-α können unter serumfreien Bedingungen dendritische Zellen aus Monozyten generiert werden

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Monozyten in Anwesenheit von GM-CSF und IFN-α in serumfreiem Medium innerhalb von drei Tagen zu DCs differenzieren. DCs haben charakteristische phänotypische und funktionelle Eigenschaften, die sie von Monozyten und

anderen Immunzellen unterscheiden und die für eine Immuntherapie relevant sind [1,151,152]. Immunphänotypisch können DCs, die aus Monozyten generiert wurden dadurch identifiziert werden, dass sie die Expression des Monozytenmarkers CD14 herunterregulieren, aber positiv für das Adhäsionsmolekül CD11c sind und gleichzeitig eine gesteigerte Expression von kostimulatorischen sowie MHC-Molekülen zeigen. Funktionell zeichnen DCs sich insbesondere dadurch aus, dass sie T-Zellen aktivieren können.

Es konnte gezeigt werden, dass IFN-DCs diese genannten DC-Eigenschaften besitzen. Sie wiesen eine typische DC-Morphologie auf. Sie waren CD11c⁺ und HLA-DR⁺ Zellen und zeigten im Vergleich zu Monozyten eine starke Reduktion von CD14 bei gleichzeitiger Zunahme der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86. Diese Beobachtungen entsprechen in guter Übereinstimmung den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die die Morphologie [89,95] und den Immunphänotyp [89,94,96] von IFN-DCs untersucht haben. In einigen Veröffentlichungen wurden stärkere Zunahmen von CD40 und CD80 als in dieser Arbeit beschrieben [94,97,153]. Dieser Unterschied ist darauf zurückzuführen, dass in den genannten Studien IFN-DCs in Anwesenheit von FCS oder humanem Serum hergestellt wurden. Solche Zusätze fördern die Hochregulation der genannten Zelloberflächenmoleküle [154]. In dieser Arbeit wurden dagegen serumfreie Bedingungen gewählt, da die DCs für den klinischen Einsatz hergestellt werden sollten.

Die IFN-DCs zeigten auch die Fähigkeit zur Stimulation von T-Zellen. Sie konnten im Vergleich zu Monozyten in einer gemischten Leukozytenreaktion allogene T-Zellen zur Proliferation anregen. In verschiedenen Arbeiten wurde zuvor beschrieben, dass IFN-DCs eine stärkere Expression von kostimulatorischen Molekülen zeigen und ein stärkeres allostimulatorisches Potenzial besitzen als unbehandelte unreife IL-4-DCs [94,96,97]. Im Vergleich zu diesen Veröffentlichungen ist in dieser Arbeit neu, dass hier IFN-DCs mit TNF- α behandelten IL-4-DCs verglichen wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass IFN-DCs auch im Vergleich zu IL-4 / TNF-DCs eine stärkere Oberflächenexpression der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD80 aufweisen, jedoch kein größeres allostimulatorisches Potenzial haben.

Eine wichtige funktionelle Eigenschaft von DCs bei der Stimulation von T-Zellen ist ausserdem die Fähigkeit, die Expression von T_H1- und T_H2-Zytokinen wie IFN- γ bzw. IL-4 in den T-Zellen zu induzieren. IFN-DCs konnten T-Zellen zur Produktion sowohl von IFN- γ als auch IL-4 stimulieren und eine balancierte T_H1 / T_H2-Immunantwort induzieren, während IL-4 / TNF-DCs eine starke Tendenz zu einer T_H1-Polarisierung von T-Zellen aufwiesen.

Eine durch DCs induzierte balancierte Immunantwort, die sowohl Typ 1 als auch Typ 2 Zytokine umfasst, hat möglicherweise den Vorteil, eine Anti-Tumor-Immunantwort verstärken zu können, indem sie neben einer zytotoxischen T-Zell-Antwort auch die Freisetzung von Antikörpern gegen Tumor-assoziierte Antigene induziert und zusätzliche Anti-Tumor-Effektorzellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen, Neutrophile oder Eosinophile mobilisiert [155,156]. Die Anwesenheit von IL-4 fördert zudem nicht nur eine T_H2 -Immunantwort, sie ist möglicherweise auch für die Etablierung einer T_H1 -Immunantwort gegen Tumorzellen wichtig. Beispielsweise entwickelten Mäuse, die kein IL-4 produzieren können, im Gegensatz zu normalen Mäusen nach der Immunisierung mit Tumorzellen keine zelluläre Immunantwort gegen diese Tumorzellen. Denselben Effekt zeigten auch normale Mäuse, die während der Immunisierung mit Anti-IL-4-Antikörpern behandelt wurden [157]. Darüberhinaus stimmen unsere Ergebnisse mit Berichten von Santini *et al.* sowie Lapenta *et al.* überein, die zeigen konnten, dass IFN-DCs eine starke zelluläre und humorale Immunantwort induzieren können [91,92,97]. Diese Arbeitsgruppen verwendeten für ihre Untersuchungen chimäre SCID (schwere kombinierte Immundefizienz) - Mäuse, die keine eigenen Immunzellen entwickeln, deren Immunsystem jedoch durch Transplantation menschlicher Lymphozyten (hu-PBL) rekonstituiert wurde (hu-PBL-SCID-Mäuse). Diese Mäuse sind ein gutes Untersuchungsmodell für die immunogene Wirkung von DCs im menschlichen Körper. Nach der Vakzinierung dieser Mäuse mit autologen, menschlichen IFN-DCs, die mit HIV-1-Peptiden beladen waren, konnten die genannten Arbeitsgruppen menschliche HIV-spezifische Antikörper [97] als auch HIV-spezifische zytotoxische T-Zellen [92] im Blut nachweisen.

Die Fähigkeit von IFN-DCs, sowohl T_H1 - als auch T_H2 -Zellen zu aktivieren, ist wahrscheinlich auf die verschiedenen Effekte von IFN- α auf DCs und T-Zellen zurückzuführen. IFN- α induziert die Expression seines eigenen Gens und fördert somit verstärkt die Freisetzung von IFN- α . Dieses Zytokin induziert in T-Zellen einerseits die Expression des Rezeptors für IL-12, ein Zytokin, welches die Differenzierung von T_H1 -Zellen fördert, die von T_H2 -Zellen jedoch supprimiert [158]. Zudem aktiviert IFN- α durch Bindung an seinen Rezeptor den Transkriptionsfaktor STAT4, der während der Differenzierung von T_H1 -Zellen auch durch den IL-12-Rezeptor aktiviert wird [39]. Andererseits unterdrückt IFN- α jedoch in hohen physiologischen Konzentrationen die Expression von IL-12 durch DCs und verhindert dadurch eine exzessive T_H1 -Polarisierung [85,159] und ermöglicht die Differenzierung von T_H2 -Zellen.

Insgesamt kann zusammenfassend gesagt werden, dass die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass IFN-DCs normale DC-Eigenschaften besitzen. Dabei zeigte sich jedoch bereits, dass Unterschiede zu den klassischen IL-4 / TNF-DCs bestehen.

4.2 IFN-DCs haben einen fortgeschrittenen Reifungszustand

Der Reifungsstatus von DCs ist ein wichtiger Parameter für die Initialisierung einer effektiven Immunantwort [152]. Die wichtigste Eigenschaft reifer DCs ist ihre Kapazität zur Migration in die Lymphknoten und zur Prozessierung und Präsentation von aufgenommenen Antigenen zur Aktivierung von Antigen-spezifischen T-Zellen. DCs sollten deshalb für den klinischen Einsatz als Vakzine phänotypische und funktionelle Eigenschaften reifer DCs besitzen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass IFN-DCs neben typischen DC-Eigenschaften auch einen fortgeschrittenen Reifungsstatus als IL-4 / TNF-DCs aufweisen. Die Daten lassen darauf schließen, dass IL-4 / TNF-DCs noch eine ausgeprägte Fähigkeit zur Phagozytose haben und an einer lokalen Immunantwort beteiligt sind, während IFN-DCs auf direktem Wege in die Lymphknoten migrieren, um eine spezifische Immunantwort auszulösen. IFN- α verursacht daher möglicherweise im Gegensatz zu TNF- α eine irreversible Reifung von DCs, die durch andere Signalwege eingeleitet wird.

Der klassische Reifemarker für DCs ist CD83, ein Adhäsionsmolekül, das in die Interaktion mit T-Zellen involviert ist. In dieser Arbeit zeigten beide DC-Präparationen nur eine marginale Zelloberflächenexpression von CD83. Dieser Reifemarker konnte in allen DCs jedoch intrazellulär nachgewiesen werden. Es wurde früher schon beschrieben, dass die Zelloberflächenexpression von CD83 posttranslational reguliert wird und dass in Monozyten, IL-4 / TNF-DCs und IFN-DCs ein intrazellulärer Pool des Proteins vorliegt [93,160]. Es ist auch bekannt, dass DCs unter serumfreien Kulturbedingungen eine niedrigere Zelloberflächenexpression von CD83 und kostimulatorischen Moleküle aufweisen [154]. Daher ist es notwendig, andere Parameter für die Analyse des Reifungszustandes von DCs heranzuziehen.

TNF- α ist in vielen Arbeiten als geeignetes Zytokin für die Induktion der Reifung von DCs beschrieben worden. Verschiedene Genexpressionsanalysen zeigten, dass TNF- α viele Gene, die mit der Reifung von DCs assoziiert sind, aktiviert [115,161,162]. Eine wichtige Rolle kommt hierbei der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B durch TNF- α zu [163]. Interessanterweise wurde in einigen Genexpressionsanalysen nach der Stimulierung von DCs und anderen Zellen durch TNF- α jedoch neben der Aktivierung des NF κ B-Signalwegs

gleichzeitig eine starke Zunahme des NF κ B-Inhibitors I κ B / NFKBIA beobachtet [116,161], was auf einen negativen Rückkopplungsmechanismus der TNF- α -vermittelten Reifung hinweist. Die Reifung durch TNF- α ist daher möglicherweise ein reversibler Prozess, bei dem die DCs nach dem zwischenzeitlichen Erwerb eines reifen Phänotyps wieder unreife Eigenschaften zurückerlangen. Ein solches Reifungsmodell ist von Nelson bereits beschrieben worden [164]. Die Genexpressionsanalyse in dieser Arbeit zeigte eine geringere Expression von I κ B / NFKBIA in IFN-DCs im Vergleich zu IL-4 / TNF-DCs. Dies spricht dafür, dass in IFN-DCs der Transkriptionsfaktor NF κ B effektiver aktiviert werden kann als in IL-4 / TNF-DCs.

Die Differenzierung und Aktivierung von DCs kann durch die Signale verschiedener antiinflammatorischer Zytokine und Wachstumsfaktoren unterdrückt werden. Die Genexpressionsanalysen in dieser Arbeit deuten daraufhin, dass IFN-DCs im Vergleich zu IL-4 / TNF-DCs weniger sensitiv für solche Signale sind. Die in IFN-DCs beobachtete geringere Expression der Gene für den Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor-Rezeptor (M-CSF R) und seinen Liganden M-CSF, deren Wechselwirkung die Differenzierung von DCs zugunsten eines Makrophagen-Phänotyps umkehren kann [132], verdeutlichen den irreversiblen Differenzierungszustand der IFN-DCs. Die geringere RNA-Menge der IL-10-Rezeptor- α -Kette (ILRA10) in IFN-DCs weist darüberhinaus darauf hin, dass IFN-DCs im Vergleich zu IL-4 / TNF-DCs weniger sensitiv für ein IL-10-vermitteltes antiinflammatorisches Signal sind. Dieses Zytokin wird von vielen Tumorzellen sezerniert, was zur Inaktivierung von Tumor-infiltrierenden DCs führt und dadurch eine effektive Anti-Tumor-Immunantwort unterdrückt [165,166].

Als alternativer Reifungsstimulus wird heute oft ein Zytokin-Gemisch aus TNF- α , IL-6, IL-1 β sowie Prostaglandin E2 verwendet. Dies verursacht eine sehr starke Zunahme von CD83 und kostimulatorischen Molekülen sowie des T-Zell-stimulatorischen Potenzials der DCs, führte jedoch auch zu einer verminderten Kapazität zur IL-12-Produktion sowie zur Induktion von IL-10 und die Aktivierung regulatorischer T-Zellen [167,168], ein Phänomen das auch als „Erschöpfung“ oder „*exhaustion*“ bezeichnet wird. Die Verwendung von IFN- α als einzigen Reifungsstimulus ist daher möglicherweise eine bessere Alternative für immuntherapeutische Anwendungen.

Heute sind einige alternative Reifemarker bekannt, die eng mit den spezifischen Funktionen reifer DCs verbunden sind. Hierzu gehören in erster Linie der Chemokin-Rezeptor CCR7 und die Fibonektin-bindende Integrin- α 4-Kette. Beide Moleküle sind wichtig für die Migration reifer DCs in die Lymphknoten [119,169]. CCR7 beeinflusst auch andere

wichtige Funktionen wie die Zytoarchitektur und das Überleben reifer DCs. Ein anderes Zelloberflächenmolekül, CD38, ein Ektoenzym und Rezeptor, kolokalisiert mit CCR7 auf reifen DCs und kooperiert mit CCR7 in der Koordination der Migration, des Überlebens und anderer funktioneller Eigenschaften reifer DCs [113]. Ein weiterer wichtiger Marker für reife DCs ist das Membranprotein DCLAMP, das in lysosomalen Klasse II-MHC-Kompartimenten reifer DCs vorliegt und für eine effektive Prozessierung aufgenommener Antigene zur Präsentation auf Klasse II MHC-Molekülen und die Aktivierung Antigen-spezifischer T-Zellen notwendig ist [117].

Die stärkere Expression all dieser Gene in IFN-DCs verdeutlicht den fortgeschrittenen Reifungsstatus von IFN-DCs gegenüber IL-4 / TNF-DCs. Die polarisierte Anordnung zytoplasmatischer Fortsätze auf IFN-DCs zusammen mit der geringeren Expression von Genen, die für die Aktinskelettbildung und -organisation verantwortlich sind sowie Vinkulin weisen ebenfalls auf den Verlust von Adhäsionsstrukturen und eine höhere Motilität von IFN-DCs hin [31]. Als funktioneller Beleg für den fortgeschrittenen Reifungszustand zeigten IFN-DCs in *Transwell*-Migrationsexperimenten in Anwesenheit des CCR7-Liganden Mip-3 β eine stärkere Migration als IL-4 / TNF-DCs. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Parlato *et al.*, die bereits zeigen konnten, dass IFN-DCs in Assoziation mit einer polarisierten Morphologie ein stärkeres migratorisches Potenzial als unbehandelte IL-4-DCs haben [95]. Die größeren RNA-Mengen in IFN-DCs für Adhäsions- und extrazelluläre Matrix-Proteine wie Decysin 1, Vitronektin und Sialoadhäsine, die in Lymphknoten vorkommen [121,122], weisen darüberhinaus darauf hin, dass sich IFN-DCs in lymphoiden Geweben integrieren können. Zusammen mit der größeren Viabilität im Vergleich zu IL-4 / TNF-DCs und der stärkeren Genexpression des antiapoptotischen Signalmoleküls bcl-2A1, das NF κ B-aktivierte Überlebenssignale in plasmazytoiden DCs [170] und differenzierenden T-Zellen vermittelt [171], legen die Ergebnisse nahe, dass IFN-DCs leichter in den Lymphknoten überleben können. Die stärkere Genexpression von Cathepsinen und DCLAMP, die in lysosomalen Klasse II-MHC-Kompartimenten reifer DCs vorhanden sind [117,172], sprechen zudem für die Fähigkeit von IFN-DCs zur Prozessierung exogener Antigene für die Präsentation auf Klasse II MHC-Molekülen und die Aktivierung Antigen-spezifischer T-Zellen.

4.3 IFN-DCs zeigen Eigenschaften von plasmazytoiden dendritischen Zellen und NK-Zellen

Die Genexpressionsanalyse bestätigte darüberhinaus, dass IFN-DCs and IL-4 / TNF-DCs zwei unterschiedliche DC-Populationen darstellen. Von 8.798 untersuchten Genen zeigten 689 Gene (8 %) eine mindestens zweifach höhere Expression in IFN-DCs oder IL-4 / TNF-DCs. Die genaue Analyse der differenziell exprimierten Gene zeigte, dass IFN-DCs neben den typischen DC-Eigenschaften auch Ähnlichkeiten mit plasmazytoiden DCs sowie NK-Zellen haben. Immunphänotypische und funktionelle Analysen zeigten zudem, dass IFN-DCs ein NK-Zell-ähnliches zytotoxisches Potenzial gegenüber Tumorzellen besitzen.

Plasmazytoide DCs unterscheiden sich von myeloiden DCs durch die Expression von CD123 sowie verschiedenen Zelloberflächenmolekülen und Transkriptionsfaktoren, die normalerweise mit der Differenzierung von lymphoiden Zellen assoziiert sind [15]. Andererseits zeigen sie keine oder nur geringe Expression myeloider Marker wie CD209. Sie sezernieren große Menge IFN- α / - β nach der Bindung viraler dsRNA oder unmethylierter CpG-haltiger DNA-Sequenzen an die Mustererkennungsrezeptoren TLR7 bzw. TLR9, die nicht oder in geringerem Maße von myeloiden DCs exprimiert werden [173]. Darüberhinaus exprimieren sie antiproliferative und antivirale Signal- und Effektormoleküle, die die virale Replikation unterbinden [174].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass IFN-DCs die genannten plasmazytoiden DC-Merkmale ausprägen. IFN-DCs waren CD123+ CD209- DCs und exprimierten deutlich geringere RNA-Mengen der myeloiden DC-Marker CD11b, CD11c und CD13 sowie des Transkriptionsfaktors Id2. Dieser Transkriptionsfaktor fördert die Differenzierung myeloider DCs und hemmt dagegen die Differenzierung von plasmazytoiden DCs [145,146]. Der plasmazytoide DC-Charakter der IFN-DCs wurde desweiteren durch eine signifikant stärkere Expression von Lymphozyten-assoziierten Genen für die Transkriptionsfaktoren Spi-B, EBF2 und t-bet, das Prä-B-Zell Gen IGLL1 sowie andere lymphoide Marker wie CD2 bestätigt.

Eine weitere Übereinstimmung von IFN-DCs und plasmazytoiden DCs ist die Expression von Genen, die an dem durch IFN- α vermittelten Signaltransduktionsweg beteiligt sind. Dieser Signalweg wird in plasmazytoiden DCs durch TLR7 bzw. TLR9 vermittelte Signale angeschaltet. Diese Rezeptoren aktivieren über das Adaptermolekül MyD88 die Transkriptionsfaktoren NF κ B und IRF7 [175]. Durch diese Transkriptionsfaktoren wird die Expression von IFN- α induziert, das seinerseits in autokriner Weise in den plasmazytoiden DCs die IFN- α -vermittelte Signalkaskade aktiviert. Dies führt in plasmazytoiden DCs schließlich zu der Expression von Genen, die eine zentrale Rolle in der Regulation der durch

IFN- α vermittelten antiviralen Immunantwort stehen [84]. Diese Gene kodieren u.A. für die Transkriptionsfaktoren STAT1, IRF7, IRF9 und nmi [175-177], antivirale Signal- und Effektormoleküle wie PKR, RIG-I, Mx1, die Oligoadenylatsynthetasen OAS1, OAS2 und OAS3 sowie IFN- β und weitere IFN-induzierte Gene wie das Gen für die Indolamin 2,3-dioxygenase (INDO). Letzteres wird oft mit der Induktion regulatorischer T-Zellen in Zusammenhang gebracht. Dieses Protein hat unter proinflammatorischen Bedingungen auf DCs jedoch eher eine aktivierende als supprimierende Wirkung [178,179]. Es wird in reifen DCs hochreguliert und spielt dort wahrscheinlich eher eine Rolle in der Inhibierung viraler Replikation als in der Regulation von T-Zellen [162].

IFN-DCs zeigten im Vergleich zu IL-4 / TNF-DCs eine stärkere Expression der meisten der genannten Gene, die in die aktiven Signalwege von plasmazytoiden DCs involviert sind. Diese umfassen das Adaptermolekül MyD88, die Transkriptionsfaktoren STAT1, IRF7 und IRF9 sowie die genannten antiviralen Signal- und Effektormoleküle. Die geringere Expression des NF κ B-Inhibitors I κ B / NFKBIA in IFN- α spricht dafür, dass NF κ B in IFN-DCs aktiviert werden kann. Eine differenzielle Genexpression von TLR7 und TLR9 konnte in IFN-DCs verglichen mit IL-4 / TNF-DCs nicht beobachtet werden. Mohty *et. al.* konnten jedoch die Expression von TLR7 auf IFN-DCs zeigen [93]. Die Ergebnisse vermitteln also das Bild, dass in IFN-DCs ähnliche Signalkaskaden stimuliert werden wie in plasmazytoiden DCs.

Schließlich weist auch die funktionelle Eigenschaft von IFN-DCs, eine eher balancierte T_H1 / T_H2-Immunantwort auszulösen, auf eine Ähnlichkeit zu plasmazytoiden DCs hin. Denn diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie im Gegensatz zu myeloiden DCs, die eher eine T_H1-Polarisierung von T-Zellen fördern, sowohl T_H1- als auch T_H2-Immunantworten auslösen können [15].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass IFN-DCs phänotypische Ähnlichkeiten zu plasmazytoiden DCs besitzen und ähnliche molekulare Mechanismen verwenden, die für die funktionellen Eigenschaften von plasmazytoiden DCs verantwortlich sind.

Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs war der Nachweis des zytotoxischen Potenzials der IFN-DCs und ihre phänotypischen Ähnlichkeiten zu NK-Zellen. Dies zeigte sich einerseits durch die stärkere Expression von TRAIL in IFN-DCs im Vergleich zu IL-4 / TNF-DCs. Fast alle IFN-DCs hatten einen intrazellulären Pool von TRAIL, während nur ein Teil der IL-4 / TNF-DCs dieses Molekül exprimierte. Auch die Zelloberflächenexpression von TRAIL konnte auf einigen IFN-DCs nachgewiesen werden.

Tatsächlich zeigten IFN-DCs, nicht aber IL-4- / TNF-DCs eine direkte zytotoxische Wirkung auf K562 Tumorzellen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Beobachtung anderer Arbeitsgruppen, dass IFN- oder LPS-aktivierte DCs eine direkte TRAIL-vermittelte Lyse verschiedener Tumorzelllinien bewirken können [54,97,180].

Eine neue Beobachtung in dieser Arbeit war die Hochregulation der Gene für die Granzyme A, B und M und der Nachweis eines intrazytoplasmatischen Pools von Granzym B in IFN-DCs. Die Expression von Granzymen in IFN-DCs weist daher auf eine mögliche Beteiligung Perforin-vermittelter Tötungsmechanismen durch IFN-DCs hin. Sowohl TRAIL als auch Granzyme sind essenzielle Bestandteile des zytolytischen Effektor-Arsenals von NK-Zellen [139,140]. Eine weitere neue Beobachtung, die ungewöhnlich für DCs ist und ein Hinweis darauf, dass IFN-DCs phänotypische Eigenschaften von NK-Zellen besitzen, war die Expression der für NK-Zellen typischen Zelloberflächenmoleküle CD56 und in geringerem Maße CD49b und NKG2D auf IFN-DCs.

Die Genexpressionsanalyse zeigte darüberhinaus weitere Ähnlichkeiten von IFN-DCs mit NK-Zellen. IFN-DCs zeigten im Vergleich mit IL-4 / TNF-DCs die differenzielle Expression der Gene für Killerzell-Lektin-ähnliche Rezeptoren (KLRF1 / NKp80, KLRC3 / NKG2E, KLRA1 / Ly49, KLRK1 / NKG2D, KLRG1 / MAFA), natürliche Zytotoxizität auslösende Rezeptoren (NCR2 / NKp44, NCR1 / NKp46) sowie aktivierende (KIR2DS1, KIR2DS3) und inhibierende (KIR3DL2, KIR2DL1) Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren. Viele der genannten NK-Zell-Rezeptoren, insbesondere NKG2D, NKp44, NKp46 und NKp80 wirken synergistisch in der Verstärkung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen [141]. Schließlich weist die stärkere Expression der Gene für die Rezeptoren der Zytokine IL-2, IL-7, IL-12 und IL-15 in IFN-DCs darauf hin, dass IFN-DCs ähnliche Signale wie NK-Zellen empfangen können. Die genannten Zytokine spielen eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und Aktivierung von NK-Zellen. IL-7 und IL-2 vermitteln in NK-Zellen Überlebenssignale bzw. regen sie zur Proliferation an [181], IL-12 und IL-15 fördern die Aktivierung der zytolytischen Effektorfunktionen [143].

DCs können darüberhinaus das zytotoxische Potenzial von NK-Zellen erhöhen, während die NK-Zellen gleichzeitig die Reifung der DCs stimulieren [46]. Die größeren RNA-Mengen in IFN-DCs für viele Zytokine und Chemokine wie IFN- β , IL-4, MCPs, CXCL-2, -3 und -7 sowie für das IL-1 β -konvertierende Enzym Caspase1 weisen schließlich darauf hin, dass IFN-DCs eine Vielzahl von Immunzellen anlocken und aktivieren können, insbesondere zytotoxische Effektorzellen des angeborenen Immunsystems wie NK-Zellen [44,133,135,136] und Neutrophile [44,134]. Die Wechselwirkung von NK-Zellen und DCs wurde in den letzten

Jahren vielfach untersucht. Tosi *et al.* haben demonstriert, dass die Reifung und das T-Zell-stimulatorische Potenzial von IFN-DCs in Gegenwart von NK-Zellen gesteigert wird [99]. Die wechselseitige Aktivierung von DCs und NK-Zellen wird möglicherweise durch die oben genannten löslichen Mediatoren vermittelt. Der NK-Zell-Charakter von IFN-DCs könnte daher zu einem positiven Rückkopplungsmechanismus beitragen, der einerseits den NK-Zell-Charakter verstärkt und andererseits zu einer weiteren Aktivierung der DCs führt.

Es ist denkbar, dass ein Teil der beobachteten Zytotoxizität der IFN-DC-Präparationen von anwesenden NK-Zellen herrührt. Da die Zahl der CD56+ NK-Zellen jedoch sehr gering war und sich nicht zwischen den IFN-DC- und IL-4 / TNF-DC-Präparationen unterschied, ist nicht davon auszugehen, dass sie alleine für die gemachten Beobachtungen verantwortlich gemacht werden können. Die Expression von CD56 wird in Kombination mit dem Fc γ -Rezeptor III / CD16 als Nachweiskriterium für NK-Zellen verwendet. CD16 ist jedoch anders als CD56, dessen Expression bislang nur auf NK-Zellen und einer kleinen Subpopulation zytotoxischer T-Zellen beobachtet wurde, ein weit verbreitetes Zelloberflächenmolekül. Es wird von NK-Zellen sowie von Neutrophilen, Monozyten, Makrophagen und DCs exprimiert. Dieses Molekül wurde ohne signifikanten Unterschied auf einem Anteil der IFN-DCs sowie IL-4 / TNF-DCs detektiert. Es ist daher unwahrscheinlich, dass die molekularen, phänotypischen und funktionellen Unterschiede zwischen IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs auf quantitative und qualitative Unterschiede anwesender NK-Zellen zurückzuführen sind.

Die Beobachtung von phänotypischen und funktionellen Eigenschaften von NK-Zellen bei den IFN-DCs ist aufgrund der kürzlichen Entdeckung der Interferon-produzierenden Killer-dendritischen Zellen (IKDCs) in der Maus von besonderem Interesse. Diese IKDCs vereinen in gleicher Weise wie IFN-DCs die molekularen, phänotypischen und funktionellen Eigenschaften von plasmazytoiden DCs als auch von NK-Zellen [55,56]. IKDCs können Tumor-spezifische T-Zellen aktivieren und das Wachstum von Tumorzellen kontrollieren. In unseren Ergebnissen fanden sich 9 höher exprimierte NK-Zell-assoziierte Gene (FasL, GZMA, GZMB, GZMM, KLRA1, MAFA, NCR1, KLRK1 und NKG7), die auch anhand der Genexpressionsanalyse von murinen IKDCs, plasmazytoiden DCs und konventionellen myeloiden DCs für IKDCs beschrieben wurden [55]. Die molekularen und funktionellen Ähnlichkeiten zwischen IFN-DCs und murinen IKDCs vermitteln das Bild, dass auch beim Menschen eine phänotypische und funktionelle Verwandtschaft zwischen DCs und NK-Zellen existiert.

Zellen mit diesen neuen Eigenschaften verdeutlichen die zentrale Rolle der DCs für das Immunsystem, indem sie einerseits eine effektive schnelle Abwehrreaktion des angeborenen

Immunsystems vermitteln und andererseits durch die Aktivierung einer adaptiven Immunantwort eine langfristige systemische Immunität erzeugen können.

In einigen Arbeiten wurde bereits beschrieben, dass humane NK-Zellen als auch Neutrophile unter proinflammatorischen Bedingungen DC-Eigenschaften erwerben. [50,51,182]. Die Expression von NK-Zell-Markern wurde auf normalen menschlichen DCs bislang noch nicht beschrieben. Allerdings wurde die Expression von CD56 auf malignen DCs bei Patienten mit seltenen malignen Erkrankungen wie dem CD56+ Langerhansschen Zell-Sarkom [183] oder CD4+CD56+ Tumorerkrankungen, die auch als „agranuläres CD4+CD56+ hematodermisches Neoplasma“ bezeichnet werden [184,185], gezeigt. Man geht davon aus, dass die Ursprungszellen dieser Tumorzellen plasmazytoide DCs sind. Denn neben CD56 exprimierten die Tumorzellen CD123 und HLA-DR, zeigten zytoplasmatische Fortsätze und ein T-Zell stimulatorisches Potenzial. Diese Beobachtungen zeigten, dass sowohl myeloide DCs (Langerhanszellen) als auch plasmazytoide DCs NK-Zell-Gene aktivieren können. Diese Kapazität von DCs ist möglicherweise durch ihre enge hämatopoetische Verwandtschaft zu erklären. Denn man geht davon aus, dass NK-Zellen und plasmazytoide DCs, aber auch myeloide DCs aus einer gemeinsamen hämatopoetischen Vorläuferzelle hervorgehen [186,187].

4.4 IFN-DCs sind eine vielversprechende Alternative für Zell-basierte Vakzinierungsstrategien

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass IFN- α nicht nur die Differenzierung von reifen DCs induziert, sondern darüberhinaus auch die Ausbildung eines speziellen plasmazytoiden DC-Typs mit NK-Zell-Eigenschaften auslöst, der neben der Initiierung einer erworbenen Immunantwort auch eine unmittelbare zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen ausüben kann.

Daher ist das Protokoll mit der Verwendung von IFN- α mindestens genauso effektiv in der Generierung reifer DCs wie das Standard-Protokoll mit IL-4 und TNF- α . IFN-DCs zeigen die phänotypischen und funktionellen Voraussetzungen, um nach dem Antigenkontakt *in vitro* und der Verabreichung im lebenden Organismus sofort in die Lymphknoten zu migrieren, um dort Antigen-spezifische T-Zellen und eine adaptive Immunantwort zu aktivieren.

Ausserdem ist die Expression einer Vielzahl von Chemokinen und Zytokinen in IFN-DCs, die insbesondere angeborene zytotoxische Immunzellen aktivieren, als auch das eigene zytotoxische Potenzial der IFN-DCs von großem Interesse für die Vakzinierung von Tumorpatienten. Die zytotoxischen Effektorzellen des angeborenen Immunsystems spielen

eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr gegen virale Infektionen und Tumorzellen [188-190]. Sie können zirkulierende Tumorzellen, die relevant für die Ausbreitung der Krankheit sind, im Blut oder in den Lymphgefäßen abtöten. Die Beobachtung des angeborenen zytotoxischen Potenzials der IFN-DCs ist auch deswegen von besonderer Bedeutung, da apoptotische wie nekrotische Tumorzellen die Quelle zur Aufnahme und Präsentation von Tumor-assoziierten Antigenen für weitere DCs darstellen [191] und damit die Immunabwehr aufrechterhalten werden kann.

Zudem zeigten IFN-DCs gegenüber IL-4 / TNF-DCs eine größere Viabilität und eine geringere Expression der Rezeptoren für IL-10 und M-CSF, so dass sie wahrscheinlich nicht zu Makrophagen differenzieren [132] und unter antiinflammatorischen Bedingungen, die bei vielen Tumorerkrankungen vorliegen [166], besser überleben [165] und die Immunantwort aufrechterhalten können.

Das Protokoll zur Generierung von DCs unter Verwendung von IFN- α ist desweiteren aufgrund der kurzen dreitägigen Kulturperiode ohne einen zusätzlichen Schritt zur Ausreifung der DCs weniger zeit- und kostenintensiv. IFN-DCs mit den beschriebenen Eigenschaften konnten auch sehr effektiv mit Hilfe des GMP-gerechten Adhärenz-Verfahrens generiert werden. Bei dieser Methode kommt es nicht zur Anwendung von CD14-Antikörpern zur Anreicherung von Monozyten, die die Funktion der DCs möglicherweise beeinflussen könnte. Zwar zeigten Adhärenz-DCs eine geringere Reinheit als DCs, die aus negativ selektionierten Monozyten gewonnen wurden, wiesen aber dennoch die gleichen phänotypischen Eigenschaften und funktionellen Kapazitäten auf. Interessanterweise zeigten in dieser Arbeit Adhärenz-IFN-DCs eine stärkere Zunahme des Reifemarkers CD83 als IFN-DCs nach Negativselektion. Diese Beobachtung spricht phänotypisch für einen weiter fortgeschrittenen Reifungszustand der Adhärenz-DCs. Dieser Effekt ist möglicherweise durch die stimulierende Wirkung kokultivierter CD4⁺ T-Zellen zu erklären [192]. Es ist denkbar, dass IFN- α durch seine stimulierende Wirkung auf T-Zellen diesen Effekt fördert. Auch die stimulierende Wirkung von anwesenden NK-Zellen auf die Reifung von IFN-DCs ist bekannt [99]. Diese waren in dieser Arbeit jedoch nur in geringen Prozentzahlen nachweisbar.

Die Daten dieser Arbeit zeigten zudem, dass IFN-DCs auch zu einem späteren Zeitpunkt appliziert werden können, ohne durch die Kryokonservierung ihre phänotypischen Eigenschaften zu verlieren. Dies ist bereits für IL-4-DCs gezeigt worden ist [193]. Da die Zellen nach Lagerung bei -80°C für mehr als zwei Monate eine verringerte Viabilität zeigten, sollten sie entweder innerhalb von zwei Monaten verwendet werden oder alternativ in flüssigem Stickstoff kryokonserviert werden.

In unserer Klinik wurden zwei Patienten mit Multiplem Myelom im Rahmen eines individuellen Heilversuchs mit DCs behandelt. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese Behandlung keine schwerwiegenden Nebenwirkungen hervorruft. Dies steht im Einklang mit den bislang veröffentlichten Vakzinierungsstudien bei Patienten mit Multiplem Myelom [68-75] (vgl. auch **Tabelle 6.1** im Anhang), bei denen lokale Rötungen oder in seltenen Fällen leichtes Fieber nach der Verabreichung von DCs festgestellt wurden. Hinsichtlich der Effektivität der Behandlung konnte nicht gezeigt werden, dass durch die Vakzinierung mit IFN-DCs ein Progress aufgehalten werden kann. Es handelt sich hierbei jedoch um einen Einzelfall, dessen Aussagekraft hinsichtlich von Ansprechraten gering ist. Darüberhinaus wurde der Patient vor der Vakzinierungstherapie bereits mit zwei Hochdosis-Chemotherapien behandelt. Die schwere chemotherapeutische Behandlung sowie der Progress der Erkrankung haben sicherlich eine funktionelle Defizienz des Immunsystems des Patienten verursacht. Aus den Erfahrungen mit vakzinierten Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom [65,67] und mit Multiplem Myelom [70], zeigte sich, dass Patienten, die nach Hochdosis-Chemotherapie als Primärtherapie in kompletter Remission waren, eine größere Wahrscheinlichkeit für ein immunologisches Ansprechen auf die Vakzinierungstherapie aufweisen als Patienten, die nur einen geringen Rückgang der Krankheitsaktivität nach Primärtherapie zeigten. Für die Ermittlung der klinischen Wirksamkeit der Vakzinierung mit IFN-DCs sind daher einerseits größere Fallzahlen erforderlich. Andererseits sollten eher Patienten in Remission als Kandidaten ausgewählt werden.

IFN- α wird erfolgreich bei der Behandlung von Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom, Multiplem Myelom und chronisch myeloischer Leukämie eingesetzt [83,106,194]. Diese therapeutischen Effekte der IFN- α -Behandlung sind möglicherweise für die Generierung von DCs mit speziellen Eigenschaften *in vivo* verantwortlich, die für die Induktion einer Anti-Tumor-Immunantwort relevant sind. Aus diesem Grund sind IFN-DCs eine vielversprechende Alternative für Vakzinierungsstrategien bei diesen Patienten, die weiter in klinischen Studien getestet werden sollten.

5 Literaturverzeichnis

1. Banchereau, J. and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
2. Langerhans, P. 1868. Über die nerven der menschlichen haut. *Archives of Pathological Anatomy* 44:325-337.
3. Steinman, R. M. and Z. A. Cohn. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J.Exp.Med.* 137:1142-1162.
4. Dubsky, P., H. Ueno, B. Piqueras, J. Connolly, J. Banchereau, and A. K. Palucka. 2005. Human dendritic cell subsets for vaccination. *J.Clin.Immunol.* 25:551-572.
5. Giebel, B., T. Zhang, J. Beckmann, J. Spanholtz, P. Wernet, A. D. Ho, and M. Punzel. 2006. Primitive human hematopoietic cells give rise to differentially specified daughter cells upon their initial cell division. *Blood* 107:2146-2152.
6. Akashi, K., T. Reya, D. Dalma-Weiszhausz, and I. L. Weissman. 2000. Lymphoid precursors. *Curr.Opin.Immunol.* 12:144-150.
7. Akashi, K., D. Traver, T. Miyamoto, and I. L. Weissman. 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404:193-197.
8. Cerwenka, A. and L. L. Lanier. 2001. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat.Rev.Immunol.* 1:41-49.
9. Sun, P. D. 2003. Structure and function of natural-killer-cell receptors. *Immunol.Res.* 27:539-548.
10. Bryceson, Y. T., M. E. March, H. G. Ljunggren, and E. O. Long. 2006. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 107:159-166.
11. Smyth, M. J., J. Swann, J. M. Kelly, E. Cretney, W. M. Yokoyama, A. Diefenbach, T. J. Sayers, and Y. Hayakawa. 2004. NKG2D recognition and perforin effector function mediate effective cytokine immunotherapy of cancer. *J.Exp.Med.* 200:1325-1335.
12. Ho, C. S., D. Munster, C. M. Pyke, D. N. Hart, and J. A. Lopez. 2002. Spontaneous generation and survival of blood dendritic cells in mononuclear cell culture without exogenous cytokines. *Blood* 99:2897-2904.
13. Caux, C., B. Vanbervliet, C. Massacrier, C. Dezutter-Dambuyant, B. Saint-Vis, C. Jacquet, K. Yoneda, S. Imamura, D. Schmitt, and J. Banchereau. 1996. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J.Exp.Med.* 184:695-706.
14. Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, I. Durand, M. Cella, A. Lanzavecchia, and J. Banchereau. 1997. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood* 90:1458-1470.
15. Liu, Y. J. 2001. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 106:259-262.
16. MacDonald, K. P., D. J. Munster, G. J. Clark, A. Dzionek, J. Schmitz, and D. N. Hart. 2002. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 100:4512-4520.
17. Cella, M., D. Jarrossay, F. Facchetti, O. Alebardi, H. Nakajima, A. Lanzavecchia, and M. Colonna. 1999. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat.Med.* 5:919-923.
18. Siegal, F. P., N. Kadowaki, M. Shodell, P. A. Fitzgerald-Bocarsly, K. Shah, S. Ho, S. Antonenko, and Y. J. Liu. 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284:1835-1837.

19. Iwasaki, A. and R. Medzhitov. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat.Immunol.* 5:987-995.
20. Apostolopoulos, V. and I. F. McKenzie. 2001. Role of the mannose receptor in the immune response. *Curr.Mol.Med.* 1:469-474.
21. Bajtay, Z., E. Csomor, N. Sandor, and A. Erdei. 2006. Expression and role of Fc- and complement-receptors on human dendritic cells. *Immunol.Lett.* 104:46-52.
22. Bryant, P. and H. Ploegh. 2004. Class II MHC peptide loading by the professionals. *Curr.Opin.Immunol.* 16:96-102.
23. Turley, S. J., K. Inaba, W. S. Garrett, M. Ebersold, J. Unternaehrer, R. M. Steinman, and I. Mellman. 2000. Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science* 288:522-527.
24. Lebre, M. C., J. C. Antons, P. Kalinski, J. H. Schuitemaker, T. M. van Capel, M. L. Kapsenberg, and E. C. De Jong. 2003. Double-stranded RNA-exposed human keratinocytes promote Th1 responses by inducing a Type-1 polarized phenotype in dendritic cells: role of keratinocyte-derived tumor necrosis factor alpha, type I interferons, and interleukin-18. *J.Invest Dermatol.* 120:990-997.
25. Bacchetta, R., S. Gregori, and M. G. Roncarolo. 2005. CD4+ regulatory T cells: mechanisms of induction and effector function. *Autoimmun.Rev.* 4:491-496.
26. O'Sullivan, B. and R. Thomas. 2003. CD40 and dendritic cell function. *Crit Rev.Immunol.* 23:83-107.
27. Richards, J., F. Le Naour, S. Hanash, and L. Beretta. 2002. Integrated genomic and proteomic analysis of signaling pathways in dendritic cell differentiation and maturation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 975:91-100.
28. Yoshimura, S., J. Bondeson, B. M. Foxwell, F. M. Brennan, and M. Feldmann. 2001. Effective antigen presentation by dendritic cells is NF-kappaB dependent: coordinate regulation of MHC, co-stimulatory molecules and cytokines. *Int.Immunol.* 13:675-683.
29. Jackson, S. H., C. R. Yu, R. M. Mahdi, S. Ebong, and C. E. Egwuagu. 2004. Dendritic cell maturation requires STAT1 and is under feedback regulation by suppressors of cytokine signaling. *J.Immunol.* 172:2307-2315.
30. Taylor, P., T. Tamura, and K. Ozato. 2006. IRF family proteins and type I interferon induction in dendritic cells. *Cell Res.* 16:134-140.
31. Winzler, C., P. Rovere, M. Rescigno, F. Granucci, G. Penna, L. Adorini, V. S. Zimmermann, J. Davoust, and P. Ricciardi-Castagnoli. 1997. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J.Exp.Med.* 185:317-328.
32. Sallusto, F., P. Schaerli, P. Loetscher, C. Schaniel, D. Lenig, C. R. Mackay, S. Qin, and A. Lanzavecchia. 1998. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur.J.Immunol.* 28:2760-2769.
33. Forster, R., A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer, I. Renner-Muller, E. Wolf, and M. Lipp. 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99:23-33.
34. Saint-Vis, B., I. Fugier-Vivier, C. Massacrier, C. Gaillard, B. Vanbervliet, S. Ait-Yahia, J. Banchereau, Y. J. Liu, S. Lebecque, and C. Caux. 1998. The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *J.Immunol.* 160:1666-1676.
35. Nagorsen, D., F. M. Marincola, and M. C. Panelli. 2004. Cytokine and chemokine expression profiles of maturing dendritic cells using multiprotein platform arrays. *Cytokine* 25:31-35.
36. Stoll, S., J. Delon, T. M. Brotz, and R. N. Germain. 2002. Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* 296:1873-1876.

37. Dilioglou, S., J. M. Cruse, and R. E. Lewis. 2003. Function of CD80 and CD86 on monocyte- and stem cell-derived dendritic cells. *Exp.Mol.Pathol.* 75:217-227.
38. Appleman, L. J., A. Berezovskaya, I. Grass, and V. A. Boussiotis. 2000. CD28 costimulation mediates T cell expansion via IL-2-independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression. *J.Immunol.* 164:144-151.
39. Moser, M. and K. M. Murphy. 2000. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat.Immunol.* 1:199-205.
40. Ohshima, Y. and G. Delespesse. 1997. T cell-derived IL-4 and dendritic cell-derived IL-12 regulate the lymphokine-producing phenotype of alloantigen-primed naive human CD4 T cells. *J.Immunol.* 158:629-636.
41. Wenner, C. A., M. L. Guler, S. E. Macatonia, A. O'Garra, and K. M. Murphy. 1996. Roles of IFN-gamma and IFN-alpha in IL-12-induced T helper cell-1 development. *J.Immunol.* 156:1442-1447.
42. Lu, J., R. L. Giuntoli, R. Omiya, H. Kobayashi, R. Kennedy, and E. Celis. 2002. Interleukin 15 promotes antigen-independent in vitro expansion and long-term survival of antitumor cytotoxic T lymphocytes. *Clin.Cancer Res.* 8:3877-3884.
43. Curtsinger, J. M., J. O. Valenzuela, P. Agarwal, D. Lins, and M. F. Mescher. 2005. Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *J.Immunol.* 174:4465-4469.
44. Piqueras, B., J. Connolly, H. Freitas, A. K. Palucka, and J. Banchereau. 2005. Upon viral exposure myeloid and plasmacytoid dendritic cells produce three waves of distinct chemokines to recruit immune effectors. *Blood.* 107: 2613-2618.
45. Gerosa, F., B. Baldani-Guerra, C. Nisii, V. Marchesini, G. Carra, and G. Trinchieri. 2002. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J.Exp.Med.* 195:327-333.
46. Walzer, T., M. Dalod, S. H. Robbins, L. Zitvogel, and E. Vivier. 2005. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* 106:2252-2258.
47. Amakata, Y., Y. Fujiyama, A. Andoh, K. Hodohara, and T. Bamba. 2001. Mechanism of NK cell activation induced by coculture with dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. *Clin.Exp.Immunol.* 124:214-222.
48. Ferlazzo, G., M. L. Tsang, L. Moretta, G. Melioli, R. M. Steinman, and C. Munz. 2002. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the Nkp30 receptor by activated NK cells. *J.Exp.Med.* 195:343-351.
49. Wilson, J. L., L. C. Heffler, J. Charo, A. Scheynius, M. T. Bejarano, and H. G. Ljunggren. 1999. Targeting of human dendritic cells by autologous NK cells. *J.Immunol.* 163:6365-6370.
50. Hanna, J., T. Gonen-Gross, J. Fitchett, T. Rowe, M. Daniels, T. I. Arnon, R. Gazit, A. Joseph, K. W. Schjetne, A. Steinle, A. Porgador, D. Mevorach, D. Goldman-Wohl, S. Yagel, M. J. LaBarre, J. H. Buckner, and O. Mandelboim. 2004. Novel APC-like properties of human NK cells directly regulate T cell activation. *J.Clin.Invest* 114:1612-1623.
51. Iking-Konert, C., C. Cseko, C. Wagner, S. Stegmaier, K. Andrassy, and G. M. Hansch. 2001. Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils: acquisition of CD83 and other functional characteristics of dendritic cells. *J.Mol.Med.* 79:464-474.
52. Josien, R., M. Heslan, J. P. Soulillou, and M. C. Cuturi. 1997. Rat spleen dendritic cells express natural killer cell receptor protein 1 (NKR-P1) and have cytotoxic activity to select targets via a Ca²⁺-dependent mechanism. *J.Exp.Med.* 186:467-472.
53. Chaperot, L., A. Blum, O. Manches, G. Lui, J. Angel, J. P. Molens, and J. Plumas. 2006. Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *J.Immunol.* 176:248-255.

54. Shi, J., K. Ikeda, N. Fujii, E. Kondo, K. Shinagawa, F. Ishimaru, K. Kaneda, M. Tanimoto, X. Li, and Q. Pu. 2005. Activated human umbilical cord blood dendritic cells kill tumor cells without damaging normal hematological progenitor cells. *Cancer Sci.* 96:127-133.
55. Chan, C. W., E. Crafton, H. N. Fan, J. Flook, K. Yoshimura, M. Skarica, D. Brockstedt, T. W. Dubensky, M. F. Stins, L. L. Lanier, D. M. Pardoll, and F. Housseau. 2006. Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat.Med.* 12:207-213.
56. Taieb, J., N. Chaput, C. Menard, L. Apetoh, E. Ullrich, M. Bonmort, M. Pequignot, N. Casares, M. Terme, C. Flament, P. Opolon, Y. Lecluse, D. Metivier, E. Tomasello, E. Vivier, F. Ghiringhelli, F. Martin, D. Klatzmann, T. Poynard, T. Tursz, G. Raposo, H. Yagita, B. Ryffel, G. Kroemer, and L. Zitvogel. 2006. A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat.Med.* 12:214-219.
57. Bensinger, W. I. 2006. The current status of reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma. *Leukemia* 20:1683-1689.
58. Markowicz, S. and E. G. Engleman. 1990. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes differentiation and survival of human peripheral blood dendritic cells in vitro. *J.Clin.Invest* 85:955-961.
59. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia. 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. *J.Exp.Med.* 179:1109-1118.
60. Romani, N., D. Reider, M. Heuer, S. Ebner, E. Kampgen, B. Eibl, D. Niederwieser, and G. Schuler. 1996. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J.Immunol.Methods* 196:137-151.
61. Zhou, L. J. and T. F. Tedder. 1996. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:2588-2592.
62. Dhodapkar, M. V., R. M. Steinman, M. Sapp, H. Desai, C. Fossella, J. Krasovsky, S. M. Donahoe, P. R. Dunbar, V. Cerundolo, D. F. Nixon, and N. Bhardwaj. 1999. Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells. *J.Clin.Invest* 104:173-180.
63. Nestle, F. O., A. Farkas, and C. Conrad. 2005. Dendritic-cell-based therapeutic vaccination against cancer. *Curr.Opin.Immunol.* 17:163-169.
64. Reichardt, V. L., P. Brossart, and L. Kanz. 2004. Dendritic cells in vaccination therapies of human malignant disease. *Blood Rev.* 18:235-243.
65. Hsu, F. J., C. B. Caspar, D. Czerwinski, L. W. Kwak, T. M. Liles, A. Syrengelas, B. Taidi-Laskowski, and R. Levy. 1997. Tumor-specific idiotypic vaccines in the treatment of patients with B-cell lymphoma--long-term results of a clinical trial. *Blood* 89:3129-3135.
66. Hsu, F. J., C. Benike, F. Fagnoni, T. M. Liles, D. Czerwinski, B. Taidi, E. G. Engleman, and R. Levy. 1996. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat.Med.* 2:52-58.
67. Timmerman, J. M., D. K. Czerwinski, T. A. Davis, F. J. Hsu, C. Benike, Z. M. Hao, B. Taidi, R. Rajapaksa, C. B. Caspar, C. Y. Okada, A. van Beckhoven, T. M. Liles, E. G. Engleman, and R. Levy. 2002. Idiotypic-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood* 99:1517-1526.
68. Cull, G., L. Durrant, C. Stainer, A. Haynes, and N. Russell. 1999. Generation of anti-idiotypic immune responses following vaccination with idiotypic-protein pulsed dendritic cells in myeloma. *Br.J.Haematol.* 107:648-655.
69. Lim, S. H. and R. Bailey-Wood. 1999. Idiotypic protein-pulsed dendritic cell vaccination in multiple myeloma. *Int.J.Cancer* 83:215-222.

70. Liso, A., K. E. Stockerl-Goldstein, S. Auffermann-Gretzinger, C. J. Benike, V. Reichardt, A. van Beckhoven, R. Rajapaksa, E. G. Engleman, K. G. Blume, and R. Levy. 2000. Idiotypic vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation for multiple myeloma. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 6:621-627.
71. Reichardt, V. L., C. Y. Okada, A. Liso, C. J. Benike, K. E. Stockerl-Goldstein, E. G. Engleman, K. G. Blume, and R. Levy. 1999. Idiotypic vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma--a feasibility study. *Blood* 93:2411-2419.
72. Reichardt, V. L., C. Milazzo, W. Brugger, H. Einsele, L. Kanz, and P. Brossart. 2003. Idiotypic vaccination of multiple myeloma patients using monocyte-derived dendritic cells. *Haematologica* 88:1139-1149.
73. Titzer, S., O. Christensen, O. Manzke, H. Tesch, J. Wolf, B. Emmerich, C. Carsten, V. Diehl, and H. Bohlen. 2000. Vaccination of multiple myeloma patients with idiotypic-pulsed dendritic cells: immunological and clinical aspects. *Br.J.Haematol.* 108:805-816.
74. Wen, Y. J., M. Ling, R. Bailey-Wood, and S. H. Lim. 1998. Idiotypic protein-pulsed adherent peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells prime immune system in multiple myeloma. *Clin.Cancer Res.* 4:957-962.
75. Yi, Q., R. Desikan, B. Barlogie, and N. Munshi. 2002. Optimizing dendritic cell-based immunotherapy in multiple myeloma. *Br.J.Haematol.* 117:297-305.
76. Houet, L. and H. Veelken. 2006. Active immunotherapy of multiple myeloma. *Eur.J.Cancer* 42:1653-1660.
77. Reichardt, V. L. and P. Brossart. 2005. Dendritic cells in clinical trials for multiple myeloma. *Methods Mol.Med.* 109:127-136.
78. Banchereau, J., A. K. Palucka, M. Dhodapkar, S. Burkeholder, N. Taquet, A. Rolland, S. Taquet, S. Coquery, K. M. Wittkowski, N. Bhardwaj, L. Pineiro, R. Steinman, and J. Fay. 2001. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res.* 61:6451-6458.
79. Nestle, F. O., S. Alijagic, M. Gilliet, Y. Sun, S. Grabbe, R. Dummer, G. Burg, and D. Schadendorf. 1998. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat.Med.* 4:328-332.
80. Thurner, B., I. Haendle, C. Roder, D. Dieckmann, P. Keikavoussi, H. Jonuleit, A. Bender, C. Maczek, D. Schreiner, D. P. von den, E. B. Brocker, R. M. Steinman, A. Enk, E. Kampgen, and G. Schuler. 1999. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J.Exp.Med.* 190:1669-1678.
81. Lu, W., L. C. Arraes, W. T. Ferreira, and J. M. Andrieu. 2004. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat.Med.* 10:1359-1365.
82. Brown, R. D., B. Pope, A. Murray, W. Esdale, D. M. Sze, J. Gibson, P. J. Ho, D. Hart, and D. Joshua. 2001. Dendritic cells from patients with myeloma are numerically normal but functionally defective as they fail to up-regulate CD80 (B7-1) expression after huCD40LT stimulation because of inhibition by transforming growth factor-beta1 and interleukin-10. *Blood* 98:2992-2998.
83. Belardelli, F. and M. Ferrantini. 2002. Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity. *Trends Immunol.* 23:201-208.
84. Samuel, C. E. 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin.Microbiol.Rev.* 14:778-809, table.
85. Biron, C. A. 2001. Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look. *Immunity.* 14:661-664.

86. Montoya, M., G. Schiavoni, F. Mattei, I. Gresser, F. Belardelli, P. Borrow, and D. F. Tough. 2002. Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood* 99:3263-3271.
87. Blanco, P., A. K. Palucka, M. Gill, V. Pascual, and J. Banchereau. 2001. Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science* 294:1540-1543.
88. Carbonneil, C., A. Aouba, M. Burgard, S. Cardinaud, C. Rouzioux, P. Langlade-Demoyen, and L. Weiss. 2003. Dendritic cells generated in the presence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN-alpha are potent inducers of HIV-specific CD8 T cells. *AIDS* 17:1731-1740.
89. Della, B. S., S. Nicola, A. Riva, M. Biasin, M. Clerici, and M. L. Villa. 2004. Functional repertoire of dendritic cells generated in granulocyte macrophage-colony stimulating factor and interferon-alpha. *J.Leukoc.Biol.* 75:106-116.
90. Di Pucchio, T., C. Lapenta, S. M. Santini, M. Logozzi, S. Parlato, and F. Belardelli. 2003. CD2+/CD14+ monocytes rapidly differentiate into CD83+ dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* 33:358-367.
91. Lapenta, C., S. M. Santini, M. Logozzi, M. Spada, M. Andreotti, T. Di Pucchio, S. Parlato, and F. Belardelli. 2003. Potent immune response against HIV-1 and protection from virus challenge in hu-PBL-SCID mice immunized with inactivated virus-pulsed dendritic cells generated in the presence of IFN-alpha. *J.Exp.Med.* 198:361-367.
92. Lapenta, C., S. M. Santini, M. Spada, S. Donati, F. Urbani, D. Accapezzato, D. Franceschini, M. Andreotti, V. Barnaba, and F. Belardelli. 2006. IFN-alpha-conditioned dendritic cells are highly efficient in inducing cross-priming CD8(+) T cells against exogenous viral antigens. *Eur.J.Immunol.* 36:2046-2060.
93. Mohty, M., A. Vialle-Castellano, J. A. Nunes, D. Isnardon, D. Olive, and B. Gaugler. 2003. IFN-alpha skews monocyte differentiation into Toll-like receptor 7-expressing dendritic cells with potent functional activities. *J.Immunol.* 171:3385-3393.
94. Paquette, R. L., N. C. Hsu, S. M. Kiertscher, A. N. Park, L. Tran, M. D. Roth, and J. A. Glaspy. 1998. Interferon-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells. *J.Leukoc.Biol.* 64:358-367.
95. Parlato, S., S. M. Santini, C. Lapenta, T. Di Pucchio, M. Logozzi, M. Spada, A. M. Giammarioli, W. Malorni, S. Fais, and F. Belardelli. 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. *Blood* 98:3022-3029.
96. Pogue, S. L., B. T. Preston, J. Stalder, C. R. Bebbington, and P. M. Cardarelli. 2004. The receptor for type I IFNs is highly expressed on peripheral blood B cells and monocytes and mediates a distinct profile of differentiation and activation of these cells. *J.Interferon Cytokine Res.* 24:131-139.
97. Santini, S. M., C. Lapenta, M. Logozzi, S. Parlato, M. Spada, T. Di Pucchio, and F. Belardelli. 2000. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *J.Exp.Med.* 191:1777-1788.
98. Santodonato, L., G. D'Agostino, R. Nisini, S. Mariotti, D. M. Monque, M. Spada, L. Lattanzi, M. P. Perrone, M. Andreotti, F. Belardelli, and M. Ferrantini. 2003. Monocyte-derived dendritic cells generated after a short-term culture with IFN-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulate a potent Epstein-Barr virus-specific CD8+ T cell response. *J.Immunol.* 170:5195-5202.
99. Tosi, D., R. Valenti, A. Cova, G. Sovena, V. Huber, L. Pilla, F. Arienti, F. Belardelli, G. Parmiani, and L. Rivoltini. 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. *J.Immunol.* 172:5363-5370.
100. Dauer, M., K. Schad, J. Junkmann, C. Bauer, J. Hertel, R. Kiefl, M. Schnurr, S. Endres, and A. Eigler. 2006. IFN-alpha promotes definitive maturation of dendritic cells generated by short-term culture of monocytes with GM-CSF and IL-4. *J.Leukoc.Biol.* 80:278-286.
 101. Radvanyi, L. G., A. Banerjee, M. Weir, and H. Messner. 1999. Low levels of interferon-alpha induce CD86 (B7.2) expression and accelerates dendritic cell maturation from human peripheral blood mononuclear cells. *Scand.J.Immunol.* 50:499-509.
 102. Dauer, M., K. Pohl, B. Obermaier, T. Meskendahl, J. Robe, M. Schnurr, S. Endres, and A. Eigler. 2003. Interferon-alpha disables dendritic cell precursors: dendritic cells derived from interferon-alpha-treated monocytes are defective in maturation and T-cell stimulation. *Immunology* 110:38-47.
 103. McRae, B. L., T. Nagai, R. T. Semnani, J. M. van Seventer, and G. A. van Seventer. 2000. Interferon-alpha and -beta inhibit the in vitro differentiation of immunocompetent human dendritic cells from CD14(+) precursors. *Blood* 96:210-217.
 104. Barlogie, B., J. Shaughnessy, G. Tricot, J. Jacobson, M. Zangari, E. Anaissie, R. Walker, and J. Crowley. 2004. Treatment of multiple myeloma. *Blood* 103:20-32.
 105. Child, J. A., G. J. Morgan, F. E. Davies, R. G. Owen, S. E. Bell, K. Hawkins, J. Brown, M. T. Drayson, and P. J. Selby. 2003. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N.Engl.J.Med.* 348:1875-1883.
 106. Rohatiner, A. Z., W. M. Gregory, B. Peterson, E. Borden, P. Solal-Celigny, A. Hagenbeek, R. I. Fisher, M. Unterhalt, R. Arranz, T. Chisesi, A. Aviles, and T. A. Lister. 2005. Meta-analysis to evaluate the role of interferon in follicular lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 23:2215-2223.
 107. Fenk, R., B. Hoyer, U. Steidl, M. Kondakci, T. Graef, R. Heuk, L. Ruf, C. Strupp, F. Neumann, U. P. Rohr, B. Hildebrandt, R. Haas, and G. Kobbe. 2005. Single-agent thalidomide for treatment of first relapse following high-dose chemotherapy in patients with multiple myeloma. *Leukemia* 19:156-159.
 108. Richardson, P. G., B. Barlogie, J. Berenson, S. Singhal, S. Jagannath, D. Irwin, S. V. Rajkumar, G. Srkalovic, M. Alsina, R. Alexanian, D. Siegel, R. Z. Orlowski, D. Kuter, S. A. Limentani, S. Lee, T. Hideshima, D. L. Esseltine, M. Kauffman, J. Adams, D. P. Schenkein, and K. C. Anderson. 2003. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N.Engl.J.Med.* 348:2609-2617.
 109. Rasmussen, T., L. Jensen, and H. E. Johnsen. 2002. The CD19 compartment in myeloma includes a population of clonal cells persistent after high-dose treatment. *Leuk.Lymphoma* 43:1075-1077.
 110. Bakkus, M. H., Y. Bouko, D. Samson, J. F. Apperley, K. Thielemans, B. Van Camp, A. Benner, H. Goldschmidt, M. Moos, and F. W. Cremer. 2004. Post-transplantation tumour load in bone marrow, as assessed by quantitative ASO-PCR, is a prognostic parameter in multiple myeloma. *Br.J.Haematol.* 126:665-674.
 111. Fenk, R., M. Ak, G. Kobbe, U. Steidl, C. Arnold, M. Korthals, A. Hunerliturkoglu, U. P. Rohr, S. Kliszewski, A. Bernhardt, R. Haas, and R. Kronenwett. 2004. Levels of minimal residual disease detected by quantitative molecular monitoring herald relapse in patients with multiple myeloma. *Haematologica* 89:557-566.
 112. Aubin, J., F. Davi, F. Nguyen-Salomon, D. Leboeuf, C. Debort, M. Taher, F. Valensi, D. Canioni, N. Brousse, B. Varet, and . 1995. Description of a novel FR1 IgH PCR strategy and its comparison with three other strategies for the detection of clonality in B cell malignancies. *Leukemia* 9:471-479.

113. Frasca, L., G. Fedele, S. Deaglio, C. Capuano, R. Palazzo, T. Vaisitti, F. Malavasi, and C. M. Ausiello. 2006. CD38 orchestrates migration, survival, and Th1 immune response of human mature dendritic cells. *Blood* 107:2392-2399.
114. Hilkens, C. M., J. F. Schlaak, and I. M. Kerr. 2003. Differential responses to IFN-alpha subtypes in human T cells and dendritic cells. *J.Immunol.* 171:5255-5263.
115. Le Naour, F., L. Hohenkirk, A. Grolleau, D. E. Misek, P. Lescure, J. D. Geiger, S. Hanash, and L. Beretta. 2001. Profiling changes in gene expression during differentiation and maturation of monocyte-derived dendritic cells using both oligonucleotide microarrays and proteomics. *J.Biol.Chem.* 276:17920-17931.
116. Zhou, A., S. Scoggin, R. B. Gaynor, and N. S. Williams. 2003. Identification of NF-kappa B-regulated genes induced by TNFalpha utilizing expression profiling and RNA interference. *Oncogene* 22:2054-2064.
117. Saint-Vis, B., J. Vincent, S. Vandenabeele, B. Vanbervliet, J. J. Pin, S. Ait-Yahia, S. Patel, M. G. Mattei, J. Banchereau, S. Zurawski, J. Davoust, C. Caux, and S. Lebecque. 1998. A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity.* 9:325-336.
118. Tsan, M. F. and B. Gao. 2004. Heat shock protein and innate immunity. *Cell Mol.Immunol.* 1:274-279.
119. Puig-Kroger, A., F. Sanz-Rodriguez, N. Longo, P. Sanchez-Mateos, L. Botella, J. Teixido, C. Bernabeu, and A. L. Corbi. 2000. Maturation-dependent expression and function of the CD49d integrin on monocyte-derived human dendritic cells. *J.Immunol.* 165:4338-4345.
120. Sato, N., S. K. Ahuja, M. Quinones, V. KostECKi, R. L. Reddick, P. C. Melby, W. A. Kuziel, and S. S. Ahuja. 2000. CC chemokine receptor (CCR)2 is required for langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells. Absence of CCR2 shifts the Leishmania major-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokines, b cell outgrowth, and sustained neutrophilic inflammation. *J.Exp.Med.* 192:205-218.
121. Berney, C., S. Herren, C. A. Power, S. Gordon, L. Martinez-Pomares, and M. H. Kosco-Vilbois. 1999. A member of the dendritic cell family that enters B cell follicles and stimulates primary antibody responses identified by a mannose receptor fusion protein. *J.Exp.Med.* 190:851-860.
122. Mueller, C. G., M. C. Rissoan, B. Salinas, S. Ait-Yahia, O. Ravel, J. M. Bridon, F. Briere, S. Lebecque, and Y. J. Liu. 1997. Polymerase chain reaction selects a novel disintegrin proteinase from CD40-activated germinal center dendritic cells. *J.Exp.Med.* 186:655-663.
123. Shezen, E., E. Okon, H. Ben Hur, and O. Abramsky. 1995. Cytokeratin expression in human thymus: immunohistochemical mapping. *Cell Tissue Res.* 279:221-231.
124. Sung, S. S., S. M. Fu, C. E. Rose, Jr., F. Gaskin, S. T. Ju, and S. R. Beaty. 2006. A major lung CD103 (alphaE)-beta7 integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing Langerin and tight junction proteins. *J.Immunol.* 176:2161-2172.
125. Ben Nasr, A., J. Haithcoat, J. E. Masterson, J. S. Gunn, T. Eaves-Pyles, and G. R. Klimpel. 2006. Critical role for serum opsonins and complement receptors CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) in phagocytosis of Francisella tularensis by human dendritic cells (DC): uptake of Francisella leads to activation of immature DC and intracellular survival of the bacteria. *J.Leukoc.Biol.* 80:774-786.
126. Rust, R., J. Kluiver, L. Visser, G. Harms, T. Blokzijl, W. Kamps, S. Poppema, and B. A. van den. 2006. Gene expression analysis of dendritic/Langerhans cells and Langerhans cell histiocytosis. *J.Pathol.* 209:474-483.

127. Namba, K., M. Nishio, K. Mori, N. Miyamoto, M. Tsurudome, M. Ito, M. Kawano, A. Uchida, and Y. Ito. 2001. Involvement of ADAM9 in multinucleated giant cell formation of blood monocytes. *Cell Immunol.* 213:104-113.
128. Hitoshi, Y., J. Lorens, S. I. Kitada, J. Fisher, M. LaBarge, H. Z. Ring, U. Francke, J. C. Reed, S. Kinoshita, and G. P. Nolan. 1998. Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells. *Immunity.* 8:461-471.
129. Akashi, K., M. Kondo, and I. L. Weissman. 1998. Role of interleukin-7 in T-cell development from hematopoietic stem cells. *Immunol.Rev.* 165:13-28.
130. Splettstoesser, W. D. and P. Schuff-Werner. 2002. Oxidative stress in phagocytes--"the enemy within". *Microsc.Res.Tech.* 57:441-455.
131. Haase, C., T. N. Jorgensen, and B. K. Michelsen. 2002. Both exogenous and endogenous interleukin-10 affects the maturation of bone-marrow-derived dendritic cells in vitro and strongly influences T-cell priming in vivo. *Immunology* 107:489-499.
132. Palucka, K. A., N. Taquet, F. Sanchez-Chapuis, and J. C. Gluckman. 1998. Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J.Immunol.* 160:4587-4595.
133. Baggiolini, M. 1998. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392:565-568.
134. Scimone, M. L., V. P. Lutzky, S. I. Zittermann, P. Maffia, C. Jancic, F. Buzzola, A. C. Issekutz, and H. E. Chuluyan. 2005. Migration of polymorphonuclear leucocytes is influenced by dendritic cells. *Immunology* 114:375-385.
135. D'Cunha, J., S. Ramanujam, R. J. Wagner, P. L. Witt, Knight E Jr, and E. C. Borden. 1996. In vitro and in vivo secretion of human ISG15, an IFN-induced immunomodulatory cytokine. *J.Immunol.* 157:4100-4108.
136. Tsuji, N. M., H. Tsutsui, E. Seki, K. Kuida, H. Okamura, K. Nakanishi, and R. A. Flavell. 2004. Roles of caspase-1 in Listeria infection in mice. *Int.Immunol.* 16:335-343.
137. Taub, D. D., S. M. Turcovski-Corrales, M. L. Key, D. L. Longo, and W. J. Murphy. 1996. Chemokines and T lymphocyte activation: I. Beta chemokines costimulate human T lymphocyte activation in vitro. *J.Immunol.* 156:2095-2103.
138. Okunishi, K., M. Dohi, K. Nakagome, R. Tanaka, and K. Yamamoto. 2004. A novel role of cysteinyl leukotrienes to promote dendritic cell activation in the antigen-induced immune responses in the lung. *J.Immunol.* 173:6393-6402.
139. Kayagaki, N., N. Yamaguchi, M. Nakayama, K. Takeda, H. Akiba, H. Tsutsui, H. Okamura, K. Nakanishi, K. Okumura, and H. Yagita. 1999. Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *J.Immunol.* 163:1906-1913.
140. Pardo, J., S. Balkow, A. Anel, and M. M. Simon. 2002. Granzymes are essential for natural killer cell-mediated and perf-facilitated tumor control. *Eur.J.Immunol.* 32:2881-2887.
141. Moretta, A., C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, C. Cantoni, M. C. Mingari, R. Biassoni, and L. Moretta. 2001. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu.Rev.Immunol.* 19:197-223.
142. Kang, H. S., E. M. Kim, S. Lee, S. R. Yoon, T. Kawamura, Y. C. Lee, S. Kim, P. K. Myung, S. M. Wang, and I. Choi. 2005. Stage-dependent gene expression profiles during natural killer cell development. *Genomics* 86:551-565.
143. Nguyen, K. B., T. P. Salazar-Mather, M. Y. Dalod, J. B. Van Deusen, X. Q. Wei, F. Y. Liew, M. A. Caligiuri, J. E. Durbin, and C. A. Biron. 2002. Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J.Immunol.* 169:4279-4287.
144. Kai, S., S. Goto, K. Tahara, A. Sasaki, S. Tone, and S. Kitano. 2004. Indoleamine 2,3-dioxygenase is necessary for cytolytic activity of natural killer cells. *Scand.J.Immunol.* 59:177-182.

145. Hacker, C., R. D. Kirsch, X. S. Ju, T. Hieronymus, T. C. Gust, C. Kuhl, T. Jorgas, S. M. Kurz, S. Rose-John, Y. Yokota, and M. Zenke. 2003. Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development. *Nat.Immunol.* 4:380-386.
146. Spits, H., F. Couwenberg, A. Q. Bakker, K. Weijer, and C. H. Uittenbogaart. 2000. Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2. *J.Exp.Med.* 192:1775-1784.
147. Blade, J., J. F. San Miguel, M. Fontanillas, A. Alcalá, J. Maldonado, J. Garcia-Conde, E. Conde, G. Conzalez-Brito, M. J. Moro, M. L. Escudero, J. Trujillo, A. Pascual, C. Rozman, J. Estape, and E. Montserrat. 1996. Survival of multiple myeloma patients who are potential candidates for early high-dose therapy intensification/ autotransplantation and who were conventionally treated. *J.Clin.Oncol.* 14:2167-2173.
148. Jenner, E. An inquiry into the causes and effects of the variolae vaccinae. *Br.Med.J.* 1-1-1798.
149. Koutsky, L. A., K. A. Ault, C. M. Wheeler, D. R. Brown, E. Barr, F. B. Alvarez, L. M. Chiacchierini, and K. U. Jansen. 2002. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N.Engl.J.Med.* 347:1645-1651.
150. Nencioni, A., F. Gruenbach, F. Patrone, and P. Brossart. 2004. Anticancer vaccination strategies. *Ann.Oncol.* 15 Suppl 4:iv153-iv160.
151. Banchereau, J. and A. K. Palucka. 2005. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat.Rev.Immunol.* 5:296-306.
152. Figdor, C. G., I. J. De Vries, W. J. Lesterhuis, and C. J. Melief. 2004. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat.Med.* 10:475-480.
153. Gauzzi, M. C., C. Purificato, K. Donato, Y. Jin, L. Wang, K. C. Daniel, A. A. Maghazachi, F. Belardelli, L. Adorini, and S. Gessani. 2005. Suppressive effect of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on type I IFN-mediated monocyte differentiation into dendritic cells: impairment of functional activities and chemotaxis. *J.Immunol.* 174:270-276.
154. Royer, P. J., S. Tanguy-Royer, F. Ebstein, C. Sapède, T. Simon, I. Barbieux, R. Oger, and M. Gregoire. 2006. Culture medium and protein supplementation in the generation and maturation of dendritic cells. *Scand.J.Immunol.* 63:401-409.
155. Hung, K., R. Hayashi, A. Lafond-Walker, C. Lowenstein, D. Pardoll, and H. Levitsky. 1998. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J.Exp.Med.* 188:2357-2368.
156. Noffz, G., Z. Qin, M. Kopf, and T. Blankenstein. 1998. Neutrophils but not eosinophils are involved in growth suppression of IL-4-secreting tumors. *J.Immunol.* 160:345-350.
157. Schuler, T., Z. Qin, S. Ibe, N. Noben-Trauth, and T. Blankenstein. 1999. T helper cell type 1-associated and cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunity is impaired in interleukin 4-deficient mice. *J.Exp.Med.* 189:803-810.
158. Rogge, L., L. Barberis-Maino, M. Biffi, N. Passini, D. H. Presky, U. Gubler, and F. Sinigaglia. 1997. Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J.Exp.Med.* 185:825-831.
159. Byrnes, A. A., X. Ma, P. Cuomo, K. Park, L. Wahl, S. F. Wolf, H. Zhou, G. Trinchieri, and C. L. Karp. 2001. Type I interferons and IL-12: convergence and cross-regulation among mediators of cellular immunity. *Eur.J.Immunol.* 31:2026-2034.
160. Cao, W., S. H. Lee, and J. Lu. 2005. CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. *Biochem.J.* 385:85-93.
161. Lindstedt, M., B. Johansson-Lindbom, and C. A. Borrebaeck. 2002. Global reprogramming of dendritic cells in response to a concerted action of inflammatory mediators. *Int.Immunol.* 14:1203-1213.

162. McIlroy, D., S. Tanguy-Royer, N. Le Meur, I. Guisle, P. J. Royer, J. Leger, K. Meflah, and M. Gregoire. 2005. Profiling dendritic cell maturation with dedicated microarrays. *J.Leukoc.Biol.* 78:794-803.
163. Neumann, M., H. Fries, C. Scheicher, P. Keikavoussi, A. Kolb-Maurer, E. Brocker, E. Serfling, and E. Kampgen. 2000. Differential expression of Rel/NF-kappaB and octamer factors is a hallmark of the generation and maturation of dendritic cells. *Blood* 95:277-285.
164. Nelson, E. L., S. Strobl, J. Subleski, D. Prieto, W. C. Kopp, and P. J. Nelson. 1999. Cycling of human dendritic cell effector phenotypes in response to TNF-alpha: modification of the current 'maturation' paradigm and implications for in vivo immunoregulation. *FASEB J.* 13:2021-2030.
165. Vicari, A. P., C. Chiodoni, C. Vaure, S. Ait-Yahia, C. Dercamp, F. Matsos, O. Reynard, C. Taverne, P. Merle, M. P. Colombo, A. O'Garra, G. Trinchieri, and C. Caux. 2002. Reversal of tumor-induced dendritic cell paralysis by CpG immunostimulatory oligonucleotide and anti-interleukin 10 receptor antibody. *J.Exp.Med.* 196:541-549.
166. Vicari, A. P., C. Caux, and G. Trinchieri. 2002. Tumour escape from immune surveillance through dendritic cell inactivation. *Semin.Cancer Biol.* 12:33-42.
167. Jongmans, W., D. M. Tiemessen, I. J. van Vlodrop, P. F. Mulders, and E. Oosterwijk. 2005. Th1-polarizing capacity of clinical-grade dendritic cells is triggered by Ribomunyl but is compromised by PGE2: the importance of maturation cocktails. *J.Immunother.* 28:480-487.
168. Langenkamp, A., M. Messi, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2000. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat.Immunol.* 1:311-316.
169. Sanchez-Sanchez, N., L. Riol-Blanco, and J. L. Rodriguez-Fernandez. 2006. The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells. *J.Immunol.* 176:5153-5159.
170. O'Keeffe, M., R. J. Grumont, H. Hochrein, M. Fuchsberger, R. Gugasyan, D. Vremec, K. Shortman, and S. Gerondakis. 2005. Distinct roles for the NF-kappaB1 and c-Rel transcription factors in the differentiation and survival of plasmacytoid and conventional dendritic cells activated by TLR-9 signals. *Blood* 106:3457-3464.
171. Mandal, M., C. Borowski, T. Palomero, A. A. Ferrando, P. Oberdoerffer, F. Meng, A. Ruiz-Vela, M. Ciofani, J. C. Zuniga-Pflucker, I. Screpanti, A. T. Look, S. J. Korsmeyer, K. Rajewsky, H. von Boehmer, and I. Aifantis. 2005. The BCL2A1 gene as a pre-T cell receptor-induced regulator of thymocyte survival. *J.Exp.Med.* 201:603-614.
172. Chapman, H. A. 1998. Endosomal proteolysis and MHC class II function. *Curr.Opin.Immunol.* 10:93-102.
173. Ito, T., Y. H. Wang, and Y. J. Liu. 2005. Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral infection by Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9. *Springer Semin.Immunopathol.* 26:221-229.
174. Barnes, B. J., J. Richards, M. Mancl, S. Hanash, L. Beretta, and P. M. Pitha. 2004. Global and distinct targets of IRF-5 and IRF-7 during innate response to viral infection. *J.Biol.Chem.* 279:45194-45207.
175. Osawa, Y., S. Iho, R. Takauji, H. Takatsuka, S. Yamamoto, T. Takahashi, S. Horiguchi, Y. Urasaki, T. Matsuki, and S. Fujieda. 2006. Collaborative action of NF-kappaB and p38 MAPK is involved in CpG DNA-induced IFN-alpha and chemokine production in human plasmacytoid dendritic cells. *J.Immunol.* 177:4841-4852.
176. Takauji, R., S. Iho, H. Takatsuka, S. Yamamoto, T. Takahashi, H. Kitagawa, H. Iwasaki, R. Iida, T. Yokochi, and T. Matsuki. 2002. CpG-DNA-induced IFN-alpha production involves p38 MAPK-dependent STAT1 phosphorylation in human plasmacytoid dendritic cell precursors. *J.Leukoc.Biol.* 72:1011-1019.

177. Zhu, M., S. John, M. Berg, and W. J. Leonard. 1999. Functional association of Nmi with Stat5 and Stat1 in IL-2- and IFN γ -mediated signaling. *Cell* 96:121-130.
178. Hwang, S. L., N. P. Chung, J. K. Chan, and C. L. Lin. 2005. Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) is essential for dendritic cell activation and chemotactic responsiveness to chemokines. *Cell Res.* 15:167-175.
179. Weber, W. P., C. Feder-Mengus, A. Chiarugi, R. Rosenthal, A. Reschner, R. Schumacher, P. Zajac, H. Misteli, D. M. Frey, D. Oertli, M. Heberer, and G. C. Spagnoli. 2006. Differential effects of the tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid on the proliferation of human CD8+ T cells induced by TCR triggering or homeostatic cytokines. *Eur.J.Immunol.* 36:296-304.
180. Vidalain, P. O., O. Azocar, H. Yagita, C. Roubourdin-Combe, and C. Servet-Delprat. 2001. Cytotoxic activity of human dendritic cells is differentially regulated by double-stranded RNA and CD40 ligand. *J.Immunol.* 167:3765-3772.
181. Colucci, F., M. A. Caligiuri, and J. P. Di Santo. 2003. What does it take to make a natural killer? *Nat.Rev.Immunol.* 3:413-425.
182. Lima, M., J. Almeida, T. M. dos Anjos, M. L. Queiros, B. Justica, and A. Orfao. 2002. The "ex vivo" patterns of CD2/CD7, CD57/CD11c, CD38/CD11b, CD45RA/CD45RO, and CD11a/HLA-DR expression identify acute/early and chronic/late NK-cell activation states. *Blood Cells Mol.Dis.* 28:181-190.
183. Kawase, T., M. Hamazaki, M. Ogura, Y. Kawase, T. Murayama, Y. Mori, H. Nagai, M. Tateno, T. Oyama, Y. Kamiya, H. Taji, Y. Kagami, T. Naoe, T. Takahashi, Y. Morishima, and S. Nakamura. 2005. CD56/NCAM-positive Langerhans cell sarcoma: a clinicopathologic study of 4 cases. *Int.J.Hematol.* 81:323-329.
184. Chaperot, L., N. Bendriss, O. Manches, R. Gressin, M. Maynadie, F. Trimoreau, H. Orfeuvre, B. Corront, J. Feuillard, J. J. Sotto, J. C. Bensa, F. Briere, J. Plumas, and M. C. Jacob. 2001. Identification of a leukemic counterpart of the plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 97:3210-3217.
185. Petrella, T., M. R. Comeau, M. Maynadie, G. Couillault, A. De Muret, C. R. Maliszewski, S. Dalac, A. Durlach, and L. Galibert. 2002. 'Agranular CD4+ CD56+ hematodermic neoplasm' (blastic NK-cell lymphoma) originates from a population of CD56+ precursor cells related to plasmacytoid monocytes. *Am.J.Surg.Pathol.* 26:852-862.
186. de Yebenes, V. G., Y. R. Carrasco, A. R. Ramiro, and M. L. Toribio. 2002. Identification of a myeloid intrathymic pathway of dendritic cell development marked by expression of the granulocyte macrophage-colony-stimulating factor receptor. *Blood* 99:2948-2956.
187. Yoshida, H., H. Kawamoto, S. M. Santee, H. Hashi, K. Honda, S. Nishikawa, C. F. Ware, Y. Katsura, and S. I. Nishikawa. 2001. Expression of alpha(4)beta(7) integrin defines a distinct pathway of lymphoid progenitors committed to T cells, fetal intestinal lymphotoxin producer, NK, and dendritic cells. *J.Immunol.* 167:2511-2521.
188. Di Carlo, E., G. Forni, P. Lollini, M. P. Colombo, A. Modesti, and P. Musiani. 2001. The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions. *Blood* 97:339-345.
189. Hallett, W. H. and W. J. Murphy. 2004. Natural killer cells: biology and clinical use in cancer therapy. *Cell Mol.Immunol.* 1:12-21.
190. Servet, C., L. Zitvogel, and A. Hosmalin. 2002. Dendritic cells in innate immune responses against HIV. *Curr.Mol.Med.* 2:739-756.
191. Larmonier, N., D. Merino, A. Nicolas, D. Cathelin, A. Besson, A. Bateman, E. Solary, F. Martin, E. Katsanis, and B. Bonnotte. 2006. Apoptotic, necrotic, or fused tumor cells: an equivalent source of antigen for dendritic cell loading. *Apoptosis.* 11:1513-1524.
192. Sporri, R. and Reis e Sousa. 2003. Newly activated T cells promote maturation of bystander dendritic cells but not IL-12 production. *J.Immunol.* 171:6406-6413.

193. Thurner, B., C. Roder, D. Dieckmann, M. Heuer, M. Kruse, A. Glaser, P. Keikavoussi, E. Kampgen, A. Bender, and G. Schuler. 1999. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J.Immunol.Methods* 223:1-15.
194. 1998. 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. *Blood* 92:1541-1548.

Lehrbuch:

Janeway, C.A., P. Travers, M. Wolpert, M. Shlomchik. 2002. Immunologie. 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

6 Anhang

6.1 Abkürzungen

A	Adenin (nach dem IUB Code)
Ag	Antigen
ADCC	Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ASO	Allel-spezifisches Oligonukleotid
BCR	B-Zell-Rezeptor
BDC	aus peripheren Blut gewonnene dendritische Zellen
BMdDC	aus hämatopoetischen Knochenmarkstammzellen generierte dendritische Zellen
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin (nach dem IUB Code)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDR	komplementaritätsbestimmende Region
CFC	<i>cytokine flow cytometry</i>
CFDA-SE	Carboxyfluorescein-Diazetat-Succinimidylester
CFU	Kolonie-bildende Einheit
CLP	gemeinsame lymphoide Progenitorzelle
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMP	gemeinsame myeloide Progenitorzelle
cpm	<i>Counts pro Minute</i>
CR	komplette Remission
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
Cy7-PE	Cyanin7-Phycoerythrin
D	Guanin, Adenin oder Thymin (nach dem IUB Code)
DC	Dendritische Zelle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immuno sorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
Fc	carboxyterminales Antikörperfragment, das die konstante Region der Immunglobulinschwerketten umfasst
FCS	fötale Kälberserum
FDR	<i>false discovery rate</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FR	Gerüstregion
FSC	Vorwärtsstreulicht
G	Guanin (nach dem IUB Code)
GITC	Guanidin-Isothiozyanat
GM-CSF	Granulozyten- / Makrophagen-kolonie-stimulierender Faktor
GMP	1. granulomonozytäre Progenitorzelle
GMP	2. <i>Good manufacturing practice</i>
GvH	<i>Graft versus host disease</i>

HDT (+ auto)	Hochdosis-Chemotherapie mit autologer Blutstammzelltransplantation
HLA	menschliches Leukozyten-Antigen
HSC	hämatopoetische Stammzelle
IC	Intrazellulär
Id	Idiotyp
IFN	Interferon
IFN-DCs	mit IFN- α und GM-CSF aus Monozyten generierte dendritische Zellen
Ig	Immunglobulin
IgH	Immunglobulinschwerkette
IKDC	Interferon-produzierende Killer-dendritische Zelle
IL	Interleukin
IL-4-DCs	unreife mit IL-4 und GM-CSF aus Monozyten generierte dendritische Zellen
IL-4 / TNF-DCs	zur Induktion der Reifung mit TNF- α behandelte IL-4-DCs
ImMo	unreife aus Monozyten generierte dendritische Zellen
IRF	Interferon regulatorischer Faktor
Iso	Isotyp-Kontrollantikörper
IV	Intravenös
IVT	<i>In vitro</i> Transkription
Jak	Janus-Kinase
KLH	<i>Keyhole Limpet</i> Hämocyanin
KM	Knochenmark
kryo	Kryokonservierung
LPS	Lipopolysaccharid
m	Männlich
MaMo	reife aus Monozyten generierte dendritische Zellen
MEP	Megakaryoerythrozytäre Progenitorzelle
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MIIC	MHC Klasse II Kompartiment
MLR	gemischte Leukozyten-Reaktion
MM	Multiples Myelom
MNC	mononukleäre Zelle
MRD	minimale Resterkrankung
NHL	Non-Hodkin-Lymphom
NKT-Zelle	Natürliche Killer-T-Zelle
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PD	progressive Krankheit
PDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll a Protein
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbolmyristatazetat
PR	partielle Remission
RQ-PCR	quantitative Real-Time-PCR
RT	reverse Transkription

S	Guanin oder Cytosin (nach dem IUB Code)
SAM	<i>Significance Analysis of Microarrays</i>
SAPE	Streptavidin-Phycoerythrin
SC	Subkutan
SD	stabile Krankheit
SI	Stimulationsindex
SSC	Seitwärtsstreulicht
STAT	Signalüberträger und Aktivatoren der Transkription
SZT	Blutstammzelltransplantation
T	Thymin (nach dem IUB Code)
TAA	Tumor assoziiertes Antigen
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	transformierender Wachstumsfaktor
TLR	Toll-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VSN	<i>Variance Stabilization Normalization</i>
w	Weiblich
W	Adenin oder Thymin (nach dem IUB Code)

6.2 Wichtige Vakzinierungsstudien

Tabelle 6.1: Zusammenfassung der wichtigsten Vakzinierungsstudien.							
Krankheit	Antigen	DC-Typ	Verabreichung	Patientenzahl	Immunreaktion	Klinisches Ansprechen	Referenz
Follikuläres B-Zell Lymphom	Idiotyp I KLH	BDC	IV	10 (Pilotphase mit messbarer Resterkrankung)	8x Id-spezifische T-Zell-Proliferation/ Anti-Id-Antikörper 10x KLH-spezifische T-Zell-Proliferation/ Antikörper	2x CR (PFS 44, 57 Monate) 1x CRu (ohne Krankheitsaktivität) 1x PR 6x PD	Hsu <i>et al.</i> 1996 [6666]
				25 (in 1. CR nach Chemotherapie)	15x Id-spezifische T-Zell-Proliferation/ Anti-Id-Antikörper 23x KLH-spezifische T-Zell-Proliferation/ Antikörper	5x CR 11x CRu (ohne Krankheitsaktivität) 7x PR 2x PD	Timmermann <i>et al.</i> 2002 [6767]
Melanom	Tumorlysat + KLH Peptide MAGE1, MAGE3, Melan A, tyrosinase gp100	ImMo	IN	16	11x DTH gegen Tumorantigen 16x DTH gegen KLH	5x Metastasen-Rückgang (2x CR, 3x PR)	Nestlé <i>et al.</i> 1998 [7979]
Melanom	Peptid MAGE3A1	MaMo	SC & ID then IV	11	8x Peptid- spezifische CTL	6x Metastasen-Rückgang	Turner <i>et al.</i> 1999 [8080]
Melanom	Melan A, MAGE3, tyrosinase gp100, Flu MP, KLH	BMdDC	ID	18	16x Peptid-spezifische T-Zellen 16x KLH-spezifische T-Zell-Proliferation	7x Metastasen-Rückgang (3x CR, 4x PR)	Banchereau <i>et al.</i> 2001 [7878]
HIV	Aldrithiol-2-inaktiviertes HIV-1	MaMo	S/C	18	8x Anti-HIV-1-CTL	8x andauernder Rückgang der viralen Belastung um > 90% für >1 Jahr	Lu <i>et al.</i> 2004 [8181]

Tabelle 6.1: Fortsetzung

Krankheit	Antigen	DC-Typ	Verabreichung	Patientenzahl	Immunreaktion	Klinisches Ansprechen	Referenz
Multiples Myelom (fortgeschritten, refraktär)	Idiotyp Protein	ImMo	IV	1	Id-spezifische CTL/ Anti-Id-Antikörper	Reduktion des Paraproteins	Wen <i>et al.</i> 1998 [74]
Multiples Myelom (fortgeschritten, refraktär)	Idiotyp	MaMo	IV	2	2x Id-spezifische T-Zell- Proliferation/ 1x Anti-Id-Antikörper KLH-spezifische T-Zell- Proliferation	2x PD	Cull <i>et al.</i> 1999 [68]
Multiples Myelom	Idiotyp Protein + KLH	ImMo	IV	6	5x Id-spezifische T-Zell- Proliferation/ Anti-Id-Antikörper 6x KLH-spezifische T-Zell- Proliferation	1x Reduktion des Paraproteins 2x SD 2x PD 1x Todesfall	Lim <i>et al.</i> 1999 [69]
Multiples Myelom (nach HDT+auto)	Idiotyp Protein + KLH	BDC	IV	12	2x Id-spezifische T-Zell-Proliferation (1/3x Id-spezifische CTL) 11x KLH-spezifische T-Zell-Proliferation	9x lebend nach mindestens 16 Monaten	Reichardt <i>et al.</i> 1999 [71]
		BDC	IV	26	4x Id-spezifische T-Zell- Proliferation 24x KLH-spezifische T-Zell- Proliferation	17x lebend nach mindestens 34 Monaten	Liso <i>et al.</i> 2000 [70]
Multiples Myelom (fortgeschritten)	Idiotyp Protein	BMdDC	SC (& SC Ag & GM-CSF)	11	5x Id-spezifische T-Zellen/ Anti-Id-Antikörper	1x SD 10 PD (1x verminderte Plasmazellinfiltration in KM)	Titzer <i>et al.</i> 2000 [73]

Tabelle 6.1: Fortsetzung							
Krankheit	Antigen	DC-Typ	Verabreichung	Patientenzahl	Immunreaktion	Klinisches Ansprechen	Referenz
Multiples Myelom (nach HDT+auto)	Idiotyp	MaMo	SC & IV (& IL-2)	5	5x Id-spezifische T-Zellen/ Anti-Id-Antikörper	1x PR (Reduktion des Paraproteins) 3x SD 1x PD	Yi <i>et al.</i> 2002 [75]
Multiples Myelom (nach HDT+auto)	Idiotyp	MaMo	IV	12	2x Id-spezifische T-Zell- Proliferation (1x TNF α Sekretion) 10x KLH-spezifische T-Zell-Proliferation und/oder Antikörper	2x SD (in PR) 10x PD (6x tot)	Reichardt <i>et al.</i> 2003 [72]

Abkürzungen: Ag, Antigen; BDC, aus peripheren Blut gewonnene dendritische Zellen; BMdDC, aus hämatopoetischen Knochenmarkstammzellen generierte dendritische Zellen; CTL, zytotoxische T-Lymphozyten; HDT+auto, Hochdosis-Chemotherapie mit nachfolgender autologer Blutstammzelltransplantation; Id, Idiotyp; ImMo, unreife aus Monozyten generierte dendritische Zellen; IV, intravenös; KLH, *Keyhole Limpet* Hämocyanin; MaMo, reife aus Monozyten generierte dendritische Zellen; PD, progressive Krankheit; PR, partielle Remission; SC, subkutan; SD, stabile Krankheit.

6.3 Differenziell exprimierte Gene in IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs

Tabelle 6.2: Ausgewählte Gene, die mindestens zweifach stärker in IFN-DCs exprimiert sind als in IL-4 / TNF-DCs mit einem q-Wert < 5 %.

Gen Symbol	Gen Name	Fold change
<i>Spezifisch durch IFN-α hochregulierte Gene</i>		
MX1	myxovirus (influenza virus) resistance 1	36.27
IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	33.18
ISG15	interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K)	27.82
IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)	16.40
IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	12.70
IFIT4	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 4	11.63
IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27	11.62
OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	10.95
OAS3	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa	9.17
IFITM2	interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D)	9.04
IRF7	interferon regulatory factor 7	8.34
OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	8.30
MX2	myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)	8.04
IFI44	interferon-induced protein 44	7.57
C1orf29	chromosome 1 open reading frame 29	7.48
G1P3	interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-6-16)	7.38
PLSCR1	phospholipid scramblase 1	5.48
TRAIL	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	5.02
CTSL	cathepsin L	4.71
ISG20	interferon stimulated gene 20kDa	4.25
LGALS3BP	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	3.86
OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	3.76
RIG-I	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide	3.75
SERPING1	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1	3.55
SP110	SP110 nuclear body protein	3.02
IFIT5	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5	2.81
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	2.75
MDA5	melanoma differentiation associated protein-5	2.71
IFRG28	28kD interferon responsive protein	2.64
HSXIAPAF1	XIAP associated factor-1	2.62
PKR*	protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent; EIF2AK2	2.39
ISGF3G	interferon-stimulated transcription factor 3, gamma 48kDa	2.33
GBP1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa	2.27
ECGF1	endothelial cell growth factor 1 (platelet-derived)	2.26
FCGR1A	Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor for (CD64)	2.15
NMI	N-myc (and STAT) interactor	2.11
IFNB1	interferon, beta 1, fibroblast	2.03
<i>Antigenaufnahme</i>		
LY6E	lymphocyte antigen 6 complex, locus E	7.66
FCN1	ficolin 1	2.84
FCGR1A*	Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor for (CD64)	2.15
<i>Antigenprozessierung</i>		
CTSL	cathepsin L	4.71
TPSB2	tryptase beta 2	4.21
LGALS3BP	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	3.86
Z39IG	Ig superfamily protein	2.73
ACP5	acid phosphatase 5, tartrate resistant	2.60

CTSD	cathepsin D (lysosomal aspartyl protease)	2.55
DCLAMP*	lysosomal-associated membrane protein 3	2.54
CD1E	CD1E antigen, e polypeptide	2.06
<hr/>		
<i>Zytotoxizität</i>		
TRAIL	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	5.02
DEFA1	defensin, alpha 1, myeloid-related sequence	4.64
ABP1	amiloride binding protein 1 (amine oxidase (copper-containing))	3.87
GZMB*	granzyme B (cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1)	3.33
HSXIAPAF1	XIAP associated factor-1	2.62
APRIL	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13	2.12
GZMM	granzyme M (lymphocyte met-ase 1)	2.09
<hr/>		
<i>Chemokine</i>		
MCP2*	chemokine (C-C motif) ligand 8	13.66
MCP1	chemokine (C-C motif) ligand 2	13.59
PPBP	chemokine (C-X-C motif) ligand 7	8.95
MCP3	chemokine (C-C motif) ligand 7	6.30
Mip2a	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	4.51
Mip2b	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	2.91
SCT	Secretin	2.28
Eotaxin2	chemokine (C-C motif) ligand 24	2.09
<hr/>		
<i>Chemokin-Rezeptoren</i>		
CCR2	chemokine (C-C motif) receptor 2	4.12
CCR7*	chemokine (C-C motif) receptor 7	2.89
C3AR1	complement component 3a receptor 1	2.82
CCR3	chemokine (C-C motif) receptor 3	2.80
FPR1	formyl peptide receptor 1	2.65
<hr/>		
<i>Zytokine</i>		
ISG15	interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K)	27.82
IL17B	interleukin 17B	2.45
IL4	interleukin 4	2.03
IFNB1	interferon, beta 1, fibroblast	2.03
<hr/>		
<i>Zytokin-Rezeptoren</i>		
IL7R	interleukin 7 receptor	8.66
<hr/>		
<i>Wachstumsfaktoren</i>		
ECGF1	endothelial cell growth factor 1	2.26
<hr/>		
<i>Proinflammation</i>		
CLC	Charot-Leyden crystal protein	4.78
HDC	Histidine decarboxylase	2.35
GCH1	GTP cyclohydrolase 1 (dopa-responsive dystonia)	2.05
CASP1*	caspase 1, apoptosis-related cysteine protease (interleukin 1, beta, convertase)	2.01
<hr/>		
<i>Antiinflammation</i>		
CD163	CD163 antigen	4.98
USP18	ubiquitin specific protease 18	4.98
PLA2G7	phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)	3.72
SERPING1	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1	3.55
PROCR	protein C receptor, endothelial (EPCR)	2.05
<hr/>		
<i>Adhäsion</i>		
SN	Sialoadhesin	2.83
TM4SF13	transmembrane 4 superfamily member 13	2.67
VTN	vitronectin (serum spreading factor)	2.58
ADAMDEC1*	ADAM-like, decysin 1	2.24
POLYDOM	likely ortholog of mouse polydom	2.19

COMP	cartilage oligomeric matrix protein	2.15
CD49d	integrin, alpha 4	2.00
<hr/>		
	<i>Zytoskelett</i>	
KRT19	keratin 19	2.59
BFSP1	beaded filament structural protein 1, filensin	2.48
BST1	bone marrow stromal cell antigen 1	2.19
KRT14	keratin 14	2.02
KRT13	keratin 13	2.00
<hr/>		
	<i>Antiapoptose</i>	
BCL2A1*	BCL2-related protein A1	3.55
TOSO	regulator of Fas-induced apoptosis	2.20
<hr/>		
	<i>Zellzyklus</i>	
CEB1	cyclin-E binding protein 1	7.94
GBP1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa	2.27

* Die differenzielle Expression dieser Gene wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR bestätigt.

Tabelle 6.3: Ausgewählte Gene, die mindestens zweifach stärker in IL-4 / TNF-DCs exprimiert sind als in IFN-DCs mit einem q-Wert < 5 %.

Gen Symbol	Gen Name	Fold change
<i>Spezifisch durch IL-4 hochregulierte Gene</i>		
ALOX15	arachidonate 15-lipoxygenase	19.16
MDC	chemokine (C-C motif) ligand 22	10.87
CD209	CD209 antigen	7.64
BCL6	B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51)	4.31
SCA1	spinocerebellar ataxia 1 (olivopontocerebellar ataxia 1, autosomal dominant, ataxin 1)	3.87
AHCYL1	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1	3.43
FCGR2B	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor for (CD32)	3.13
ALOX5	arachidonate 5-lipoxygenase	3.10
VCL	Vinculin	3.10
FCER2	Fc fragment of IgE, low affinity II, receptor for (CD23A)	2.95
BHLHB2	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2	2.89
QSCN6	quiescin Q6	2.84
ICSBP1	interferon consensus sequence binding protein 1	2.82
RPL5	ribosomal protein L5	2.70
NFIL3	nuclear factor, interleukin 3 regulated	2.58
CLTC	clathrin, heavy polypeptide (Hc)	2.51
RAGD	Ras-related GTP binding D	2.37
CD205	lymphocyte antigen 75	2.30
PRKRA	protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator	2.11
GBP2	guanylate binding protein 2, interferon-inducible	2.08
HOMER2	homer homolog 2 (Drosophila)	2.07
<i>Spezifisch durch TNFα hochregulierte Gene</i>		
WNT5A	wingless-type MMTV integration site family, member 5A	4.70
SPINT2	serine protease inhibitor, Kunitz type, 2	3.27
CLIC4	chloride intracellular channel 4	3.16
JUNB	jun B proto-oncogene	3.13
NFKBIA	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	3.08
MAN2A1	mannosidase, alpha, class 2A, member 1	2.87
RPS8	ribosomal protein S8	2.85
UMP-CMPK	UMP-CMP kinase	2.82
RPL10A	ribosomal protein L10a	2.76
TNIP1	TNFAIP3 interacting protein 1	2.75
TRIP15	thyroid receptor interacting protein 15	2.61
TEGT	testis enhanced gene transcript (BAX inhibitor 1)	2.59
PRDX2	peroxiredoxin 2	2.54
TIEG	TGFB inducible early growth response	2.54
TNFAIP3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	2.50
ATP5G2	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9), isoform 2	2.37
CCL4	chemokine (C-C motif) ligand 4	2.37
ACLY	ATP citrate lyase	2.28
EGR1	early growth response 1	2.08
EEF2	eukaryotic translation elongation factor 2	2.02
<i>Antigenaufnahme</i>		
DCSIGN	CD209 antigen	7.64
C1QA	complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide	4.69
C1QR1	complement component 1, q subcomponent, receptor 1	4.55
C3	complement component 3	3.39
FCGR2B	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor for (CD32)	3.13
FCER2	Fc fragment of IgE, low affinity II, receptor for (CD23A)	2.95

RAC2	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	2.82
CD205	lymphocyte antigen 75	2.30
FCAR	Fc fragment of IgA, receptor for	2.19
PIGF	phosphatidylinositol glycan, class F	2.19
SCARF1	scavenger receptor class F, member 1	2.05
IGBP1	immunoglobulin (CD79A) binding protein 1	2.04
<hr/>		
<i>Antigenprozessierung</i>		
CD13	alanyl (membrane) aminopeptidase	4.21
CSTA	cystatin A (stefin A)	2.52
HSPA9B	heat shock 70kDa protein 9B (mortalin-2)	2.52
CSTC	cystatin C (amyloid angiopathy and cerebral hemorrhage)	2.27
HSPD1	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	2.26
CSTB	cystatin B (stefin B)	2.25
TAPBP	TAP binding protein (tapasin)	2.18
HSPC051	ubiquinol-cytochrome c reductase complex (7.2 kD)	2.16
HSPH1	heat shock 105kDa/110kDa protein 1	2.07
<hr/>		
<i>Zytotoxizität</i>		
RTN3	reticulon 3	2.55
MMD	monocyte to macrophage differentiation-associated	2.18
CAMP	cathelicidin antimicrobial peptide	2.09
<hr/>		
<i>Chemokine</i>		
MDC	chemokine (C-C motif) ligand 22	10.87
RANTES	chemokine (C-C motif) ligand 5	5.03
MIF	macrophage migration inhibitory factor	2.97
MIP3	chemokine (C-C motif) ligand 23	2.38
MIP1β	chemokine (C-C motif) ligand 4	2.37
CKLF	chemokine-like factor	2.11
<hr/>		
<i>Chemokin-Rezeptoren</i>		
HM74	putative chemokine receptor	2.33
<hr/>		
<i>Zytokin-Rezeptoren</i>		
IL1R1	interleukin 1 receptor, type I	2.40
IL10RA	interleukin 10 receptor, alpha	2.37
IFNGR2	interferon gamma receptor 2	2.33
<hr/>		
<i>Wachstumsfaktoren</i>		
PDGFC	platelet derived growth factor C	6.77
CRH	corticotropin releasing hormone	4.04
M-CSF	colony stimulating factor 1 (macrophage)	3.33
INHBA	inhibin, beta A	2.60
VEGF	vascular endothelial growth factor	3.78
<hr/>		
<i>Wachstumsfaktor-Rezeptoren</i>		
M-CSF R	colony stimulating factor 1 receptor	2.10
<hr/>		
<i>Proinflammation</i>		
ALOX15	arachidonate 15-lipoxygenase	19.16
ALOX5	arachidonate 5-lipoxygenase	3.10
CPD	carboxypeptidase D	2.49
ASC	apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	2.31
TRIM8	tripartite motif-containing 8	2.04
<hr/>		
<i>Koagulation</i>		
F13A1	coagulation factor XIII, A1 polypeptide	4.28
F8	coagulation factor VIII, procoagulant component (hemophilia A)	2.05
PRCP	prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C)	2.03

	<i>Antiinflammation</i>	
SERPINE1	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	8.86
SPINT2	serine protease inhibitor, Kunitz type, 2	3.27
TNIP1	TNFAIP3 interacting protein 1	2.75
THBD	Thrombomodulin	2.61
TNFAIP3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	2.50
PTDSS1	phosphatidylserine synthase 1	2.22
	<i>Adhäsion</i>	
CD11b	integrin, alpha M	4.64
CD103	integrin, alpha E	4.37
CD11c	integrin, alpha X	4.27
MMP12	matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)	3.58
CD99	CD99 antigen	3.43
P4HA1	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha polypeptide I	2.88
CD44	CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)	2.78
RAP1A	RAP1A, member of RAS oncogene family	2.72
CD4	CD4 antigen	2.64
ADAM9	a disintegrin and metalloproteinase domain 9	2.58
SPP1	secreted phosphoprotein 1 (osteopontin)	2.51
CD49e	integrin, alpha 5	2.50
TIMP1	tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (erythroid potentiating activity, collagenase inhibitor)	2.47
RAP1GDS1	RAP1, GTP-GDP dissociation stimulator 1	2.44
TJP2	tight junction protein 2 (zona occludens 2)	2.38
ITGB1BP1	integrin beta 1 binding protein 1	2.37
CD97	CD97 antigen	2.30
RAP1GA1	RAP1, GTPase activating protein 1	2.18
SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	2.18
CD18	integrin, beta 2	2.12
PCSK5	proprotein convertase subtilisin/kexin type 5	2.04
ADD3	adducin 3 (gamma)	2.03
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1 (CD54)	2.02
TGFBI	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	2.01
	<i>Zytoskelett</i>	
PSTPIP2	proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 2	3.69
TUBA3	tubulin, alpha 3	3.38
VCL	Vinculin	3.10
DSTN	destrin (actin depolymerizing factor)	2.91
TNS	Tensin	2.84
JWA	cytoskeleton related vitamin A responsive protein	2.80
RIL	LIM domain protein	2.75
OK/SW-cl.56	beta 5-tubulin	2.65
FLNA	filamin A, alpha (actin binding protein 280)	2.64
S100A4	S100 calcium binding protein A4 (calvasculin)	2.47
ACTN1	actinin, alpha 1	2.33
CAPZB	capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta	2.33
CAST	Calpastatin	2.32
SPTAN1	spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin)	2.32
VIL2	villin 2 (ezrin)	2.27
LCP1	lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)	2.21
GAPCENA	rab6 GTPase activating protein (GAP and centrosome-associated)	2.19
DIAPH1	diaphanous homolog 1 (Drosophila)	2.18
D10S170	DNA segment on chromosome 10 (unique) 170	2.13
PACSIN2	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 2	2.13
DIAPH2	diaphanous homolog 2 (Drosophila)	2.10

	<i>Antiapoptose und Zytoprotektion</i>	
GPX3	glutathione peroxidase 3 (plasma)	5.40
MT1X	metallothionein 1X	4.38
CAT	Catalase	3.21
ABCC3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	2.98
	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein,	
YWHAQ	theta polypeptide	2.91
MT1H	metallothionein 1H	2.69
MT2A*	metallothionein 2A	2.62
TEGT	testis enhanced gene transcript (BAX inhibitor 1)	2.59
PRDX2	peroxiredoxin 2	2.54
PEA15	phosphoprotein enriched in astrocytes 15	2.54
PXF	peroxisomal farnesylated protein	2.50
NDRG1	N-myc downstream regulated gene 1	2.35
PRDX6	peroxiredoxin 6	2.23
MCL1	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	2.15
TNFAIP8	TNF-induced protein	2.14
PRDX3	peroxiredoxin 3	2.14
PPIC	peptidylprolyl isomerase C (cyclophilin C)	2.09
	<i>Apoptose</i>	
CYCS	cytochrome c, somatic	2.17
MTCH1	mitochondrial carrier homolog 1 (C. elegans)	2.16
VDAC1	voltage-dependent anion channel 1	2.02
	<i>Zellzyklus</i>	
G0S2	putative lymphocyte G0/G1 switch gene	4.77
CCND2*	cyclin D2	4.13
QSCN6	quiescin Q6	2.84
CCNG1	cyclin G1	2.72
ITPR1	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1	2.57
MFHAS1	malignant fibrous histiocytoma amplified sequence 1	2.53
AKAP11	A kinase (PRKA) anchor protein 11	2.43
BTG2	BTG family, member 2	2.42
CCNI	cyclin I	2.39
PPP1CC	protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isoform	2.37
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3 related	2.37
PTPRO	protein tyrosine phosphatase, receptor type, O	2.34
SEL1L	sel-1 suppressor of lin-12-like (C. elegans)	2.29
CCNG2	cyclin G2	2.23
PDCD4	programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)	2.19
CDK2AP1	CDK2-associated protein 1	2.12
PPM1B	protein phosphatase 1B (formerly 2C), magnesium-dependent, beta isoform	2.08

* Die differenzielle Expression dieser Gene wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR bestätigt.

Tabelle 6.4: Wichtige Gene für die Aktivierung und Funktion von NK-Zellen, die mit einem q-Wert < 5 % signifikant stärker in IFN-DCs als in IL-4 / TNF-DCs exprimiert sind.

Gen Symbol	Gen Name	Fold change
<i>Gene, die von NK-Zellen exprimiert werden</i>		
IL7R	interleukin 7 receptor	8.66
INDO	indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase	6,38
TRAIL	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	5.02
DEFA1	defensin, alpha 1, myeloid-related sequence	4.64
GZMB	granzyme B (cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1)	3.33
GZMM	granzyme M (lymphocyte met-ase 1)	2.09
KLRF1	killer cell lectin-like receptor subfamily F, member 1; NKp80	1.91
LAG3	lymphocyte-activation gene 3; CD223	1.88
LTB	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)	1.83
GZMA	granzyme A (cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 3)	1.83
NKG7	natural killer cell group 7 sequence	1.77
CD2	CD2 antigen (p50), sheep red blood cell receptor	1.64
NCR2	natural cytotoxicity triggering receptor 2; NKp44	1.55
IL2RB	interleukin 2 receptor, beta	1.53
IL12RB2	interleukin 12 receptor, beta 2	1.48
KLRC3	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 3; NKG2E	1.45
NCR1	natural cytotoxicity triggering receptor 1; NKp46	1.45
NK1	CD160 antigen	1.42
KIR3DL2	killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 2	1.41
KLRA1	killer cell lectin-like receptor subfamily A, member 1; LY49	1.34
IL12RB1	interleukin 12 receptor, beta 1	1.33
KIR2DS1	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 1	1.33
CD96	CD96 antigen	1.33
FasL	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 6	1.32
CD49b	integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)	1.30
CXCR3	chemokine (C-X-C motif) receptor 3	1.27
KIR2DL1	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 1	1.27
CD56	neural cell adhesion molecule 1; NCAM1	1.27
KLRK1	killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1; NKG2D	1.27
IFNG	interferon, gamma	1.21
IL15RA	interleukin 15 receptor, alpha	1.21
KIR2DS3	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 3	1.19
KLRG1	killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 1; MAFA	1.19
<i>Mobilisierung und Aktivierung von NK-Zellen</i>		
ISG15	interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K)	27.82
MCP1	chemokine (C-C motif) ligand 2	13.59
PPBP	pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)	8.95
IFNB1	interferon, beta 1, fibroblast	2.03
CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine protease (interleukin 1, beta, convertase)	2.01
IL12A	interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35)	1.37
IL12B	interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40)	1.24

Tabelle 6.5: Ausgewählte Gene, die typischerweise von plasmazytoiden oder myeloiden DCs exprimiert werden und in IFN-DCs und IL-4 / TNF-DCs mit einem q-Wert <5% signifikant unterschiedlich exprimiert sind.

Gen Symbol	Gen Name	Fold change
<i>Gene, die von plasmazytoiden DCs exprimiert werden</i>		
Mx1	myxovirus (influenza virus) resistance 1	36,27
OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	10,95
OAS3	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa	9,17
IRF7	interferon regulatory factor 7	8,34
OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	8,30
INDO	indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase	6,38
RIG-I	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide	3,75
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	2,75
PKR	protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent	2,39
ISGF3G	interferon-stimulated transcription factor 3, gamma 48kDa; IRF9	2,33
Nmi	N-myc (and STAT) interactor	2,11
IFNB	interferon, beta 1, fibroblast	2,03
MYD88	myeloid differentiation primary response gene (88)	1,89
EBF2	early B-cell factor 2	1,81
CD2	CD2 antigen (p50), sheep red blood cell receptor	1,64
CD123	interleukin 3 receptor, alpha (low affinity)	1,62
CD7	CD7 antigen (p41)	1,58
SPIB	Spi-B transcription factor (Spi-1/PU.1 related)	1,57
TCF7L	transcription factor 7-like 1 (T-cell specific, HMG-box); E2A	1,27
TBX21	T-box 21; TBET	1,27
<i>Gene, die von myeloiden DCs exprimiert werden</i>		
CD209	CD209 antigen	7,64
CD11b	integrin, alpha M (complement component receptor 3, alpha; macrophage antigen alpha polypeptide)	4,64
CD11c	integrin, alpha X (antigen CD11C (p150), alpha polypeptide)	4,27
CD13	alanyl (membrane) aminopeptidase (aminopeptidase N, aminopeptidase M, microsomal aminopeptidase, CD13, p150)	4,21
ID2	inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein	2,08

6.4 Zusammenfassung

Die Entwicklung von Impfstoffen mit dendritischen Zellen (DCs) ist seit mehr als zehn Jahren Gegenstand intensiver Forschung. DC-basierte Vakzine konnten in einigen Patienten Tumorspezifische Immunantworten auslösen. Trotz großer Bemühungen konnte jedoch eine therapeutische Wirksamkeit der Behandlung mit DCs bislang nur bei einer begrenzten Zahl von Patienten gezeigt werden.

Auf der Suche nach einem alternativen Weg zur Generierung von DCs wurden in dieser Arbeit die molekularen, phänotypischen und funktionellen Eigenschaften von DCs, die mit GM-CSF und IFN- α generiert wurden, im Vergleich zu herkömmlich mit GM-CSF und IL-4 generierten und mit TNF- α behandelten DCs (IL-4 / TNF-DCs) untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sowohl IFN-DCs als auch IL-4 / TNF-DCs typische DC-Eigenschaften besitzen. Dennoch wiesen beide DC-Populationen einen individuellen molekularen und funktionalen Phänotyp auf. Der auffälligste Unterschied lag darin, dass IFN-DCs im Vergleich zu IL-4 / TNF-DCs Eigenschaften plasmazytoider DCs besaßen und gleichzeitig eine gesteigerte Expression von NK-Zell-assoziierten Genen sowie eine direkte zytotoxische Wirkung gegen Tumorzellen zeigten. Der zweite wichtige Unterschied war, dass IFN-DCs verglichen mit IL-4 / TNF-DCs Anzeichen für einen fortgeschrittenen Reifungs- und Aktivierungsgrad und eine größere Kapazität zur Migration in die Lymphknoten aufwiesen.

Mit beiden Methoden wurden CD11c⁺ CD86⁺ HLA-DR⁺ Zellen mit einer typischen DC-Morphologie hergestellt. Eine Genexpressionsanalyse zeigte, dass es sich um zwei unterschiedliche DC-Populationen handelt. IFN-DCs hatten Eigenschaften von reifen plasmazytoiden DCs in Kombination mit Eigenschaften von NK-Zellen. Sie waren CD123⁺ Zellen und wiesen eine stärkere Expression der Gene für IFN- β , TRAIL, Granzyme, KLRs and andere NK-Zell-Rezeptoren auf. In 90% der IFN-DCs wurde ein intrazytoplasmatischer *Pool* an TRAIL und Granzym B beobachtet. Darüberhinaus zeigten IFN-DCs eine zytolytische Aktivität gegenüber K562-Tumorzellen. Durchflusszytometrisch konnte nach Färbung mit Propidiumiodid eine mediane spezifische Lyse der Tumorzellen durch IFN-DCs von 28% ermittelt werden, während IL-4 / TNF-DCs dagegen keine Tumorzellyse induzierten ($p=0.008$). IFN-DCs zeigten gleichzeitig normale DC-Funktionen und konnten in einer gemischten Leukozytenreaktion effizient T-Zellen stimulieren. Desweiteren hatten IFN-DCs größere Mengen der RNA für die Reifemarker DCLAMP, CCR7 und CD49d und wiesen eine 2,3-fach stärkere Migration als IL-4 / TNF-DCs in Transwell-Experimenten auf ($p=0.01$). Andererseits hatten IL-4 / TNF-DCs einen ausgeprägteren myeloiden DC-Phänotyp, der durch die Oberflächenexpression von CD209 gekennzeichnet war. Sie zeigten eine stärkere

Expression von Genen, die mit der Phagozytose und der Stimulierung einer lokalen Immunantwort assoziiert sind. Diese umfassen die Gene für Fc-Rezeptoren, Komplement-Rezeptoren sowie Integrin-Ketten, die an der Adhäsion in Epithelien und entzündeten Geweben beteiligt sind.

Die Arbeit zeigte zudem, dass IFN-DCs für den klinischen Einsatz generiert werden können. Ein Patient, der in unserer Klinik mit IFN-DCs behandelt wurde, zeigte eine gute Verträglichkeit des Vakzins. Für die Ermittlung der klinischen Wirksamkeit der Behandlung mit IFN-DCs sind jedoch größere Fallzahlen erforderlich.

Zusammenfassend legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass IFN-DCs nicht nur in der Lage sind, eine erworbene spezifische Immunantwort in den Lymphknoten zu induzieren sondern darüberhinaus auch eine angeborene Anti-Tumor-Antwort vermitteln können. Diese neuen positiven Eigenschaften von IFN-DCs sind möglicherweise relevant für zukünftige Vakzinierungsstrategien. Daher sollten IFN-DCs in klinischen Studien getestet werden.

6.5 Summary

Dendritic cell (DC) based vaccines for patients with malignant diseases generated under different culture conditions have been investigated for more than a decade. They can induce antitumor immune responses in some patients. Despite these efforts, clinical results of DC vaccination studies showed therapeutic efficacy only in a limited number of patients so far. In search of an alternative way for DC generation we examined the molecular and functional characteristics of monocyte derived human DCs generated with GM-CSF and IFN- α (IFN-DCs) in comparison to DCs generated by the classical protocol using GM-CSF and IL-4 / TNF- α (IL-4 / TNF-DCs).

We could show that both, IFN-DCs and IL-4 / TNF-DCs, display typical DC characteristics, but also have distinct molecular and functional phenotypes. Strikingly, IFN-DCs showed a more plasmacytoid phenotype associated with NK cell characteristics. On the other hand, our results also confirm previous reports that IFN-DCs have signs of a pronounced maturation state and an increased migratory capacity to the lymph nodes in comparison to IL-4 / TNF-DC.

Both methods resulted in CD11c⁺ CD86⁺ HLA-DR⁺ cells with a typical DC morphology. Gene expression profiling revealed two distinct DCs populations. IFN-DCs combined mature plasmacytoid DC with natural killer cell characteristics. They were CD123⁺ and showed higher RNA levels for IFN- β , TRAIL, granzymes, KLRs and other NK cell receptors. Intracytoplasmatic TRAIL and granzyme B were observed in 90% of IFN-DCs. Moreover, IFN-DCs displayed cytolytic activity against K562 cells with a median specific lysis of 28% as determined by propidium iodide uptake, whereas IL-4 / TNF-DCs did not induce any tumor cell lysis ($p=0.008$). Simultaneously, IFN-DCs had normal DC functions as they efficiently stimulated T cells in mixed leukocyte reactions. Further, IFN-DCs showed higher RNA levels for the maturation markers DCLAMP, CCR7 and CD49d and displayed a 2.3 fold greater migration in transwell experiments ($p=0.01$) than IL-4 / TNF-DCs. On the other hand, IL-4 / TNF-DCs had a more myeloid phenotype characterized by the surface expression of CD209 and showed higher expression levels of genes involved in phagocytosis and local immune responses including Fc receptors, complement receptors as well as integrins related to adhesion to epithelium and inflammed tissue.

Further, we could show that IFN-DCs can be generated for the clinical use. In our departement one patient with Multiple Myeloma was treated with IFN-DCs. The vaccine was well tolerated. Still, for the investigation of the clinical efficacy of IFN-DCs, a higher number of patients is necessary.

In conclusion, our results suggest that IFN-DCs can not only stimulate adaptive but also mediate innate antitumor immune responses. This could be relevant for future vaccination strategies. Therefore, IFN-DCs should be tested in clinical trials.

6.6 Danksagung

Zunächst möchte ich mich vielmals bei Dr. Ralf Kronenwett für die gute Zusammenarbeit, die aufmerksame Unterstützung meiner Arbeit und die Begutachtung meiner Dissertation bedanken.

Besonderen Dank möchte ich auch Dr. Roland Fenk für die anregende, effektive und geduldige Betreuung meiner Arbeit und seine Hilfe entgegenbringen.

Bei Professor Dr. Rainer Haas möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, dass ich an der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie an diesem interessanten Projekt arbeiten konnte, sowie für die vielseitigen wissenschaftlichen und kritischen Anregungen.

Vielen Dank auch an Dr. Guido Kobbe für die Diskussion bei wissenschaftlichen und technischen Fragestellungen.

Zudem möchte ich mich herzlich bei allen Kollegen der Klinik für ihre Hilfsbereitschaft, die schöne Zusammenarbeit und Gespräche bedanken, insbesondere bei Elena Diaz Blanco, Sascha Raschke, Stefanie Brookmann, Nancy Safaian, Maritza Lara, Dagmar Maihöfer, Simone Bork, Sabrina Pechtel, Anne Koch, Monika Pooten, Caroline Arnold, Elke Rosenbaum-König, Anke Böckmann, Maria Wolf und Hildegard Gaussmann. Auch Dr. Claudia Papewalis und Dr. Matthias Schott aus der Klinik für Endokrinologie sowie Dr. Bernd Prisak und Dr. Gernod Röder gilt an dieser Stelle meine Dankbarkeit für ihre Hilfe.

Prof. Dr. Joachim F. Ernst gilt mein herzlicher Dank für die freundliche Bereiterklärung zur Begutachtung meiner Dissertation.

Mein spezieller Dank gilt meiner Mutter und Freunden, die mich während der Zeit dieser Arbeit unterstützt haben sowie Benno Schadt, der mir die Begeisterung für die Biologie vermittelt hat.

Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

(Mark Korthals)