

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
des St.Josef-Hospitals Bochum
- Universitätsklinik -
der Ruhr-Universität Bochum
Direktor: Prof.Dr.med.ChristianRieger

**Die Expression der Oberflächenantigene
CD1c, CD141, CD303 und CD304
durch stammzellgenerierte myeloide dendritische Zellen
unterschiedlicher Differenzierungsstadien**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Anne-Lie Lukas
aus Bochum
2007

Dekan:	Prof.Dr.med. G.Muhr
Referent:	Prof.Dr.med.U.Schauer
Koreferent:	PD.Dr.med. T. Bauer

Tag der Mündlichen Prüfung: 26. Juni 2007

Ich widme meine Dissertation mit Dankbarkeit
meiner Mutter, die getreu Ihrem Sternzeichen
wie eine Löwin für Ihre Jungen kämpft
und mit viel Liebe und Ausdauer
so oft das Unmögliche möglich gemacht hat

Der Mensch ist mehr, als er von sich weiß.
Er ist nicht, was ein für alle Mal ist, sondern er ist der Weg.
Karl Jaspers

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1. Das humane Immunsystem hat angeborene und erworbene Eigenschaften.....	1
1.2. Die Definition und Klassifikation der dendritischen Zellen	2
1.2.1. Die Entdeckung der ersten dendritischen Zellen: die Langerhans-Zellen der Haut	2
1.2.2. Die Namensgebung und Definition der dendritischen Zellen	2
1.3. Herkunft und Entwicklung dendritischer Zellen	4
1.3.1. Die Herkunft der dendritischen Zellen	4
1.3.2. Subpopulationen dendritischer Zellen	5
1.3.2.1. Plasmazytoide dendritische Zellen	6
1.3.2.2. Myeloide dendritische Zellen	7
1.3.3. Die Entwicklung und Reifung der dendritischen Zellen	7
1.4. Funktionen dendritischer Zellen	9
1.4.1. Eigenschaften unreifer dendritischer Zellen.....	9
1.4.1.1. Die Antigen-Aufnahme erfolgt mit unterschiedlichen Mechanismen und erfordert Cofaktoren	9
1.4.1.2. Die Mechanismen der Antigenaufnahme sind vielfältig	10
1.4.2. Die Reifung dendritischer Zellen erfolgt nach Kontakt mit Pathogenen oder inflammatorischen Stimuli und führt zu veränderten Funktionen	11
1.4.2.1. Die MHC-Moleküle sind wichtig für die Verarbeitung und Präsentation der Antigene.....	12
1.4.2.2. Wechselseitige Interaktionen von dendritischen Zellen und T-Zellen	13
1.5. Die Verwendung von dendritischen Zellen in der aktuellen Forschung, Diagnostik und Therapie.....	16
1.6. Zur Identifizierung wurden spezifische Oberflächenmoleküle betrachtet	17
1.6.1. Die Oberflächenmarker CD34 und CD133 identifizieren hämatopoetische Vorläuferzellen.....	17
1.6.2. CD1a wird von reifen, polarisierten myeloiden dendritischen Zellen exprimiert	18
1.6.3. CD14 wird von monozytoiden Zellen exprimiert	18
1.6.4. CLA, das „Skin-homing molecule“ wird auf aktivierten Leukozyten der Haut gefunden	19
1.7. Zur Anzucht und gezielten Differenzierung der Zielzellen werden bewährte Stimuli verwendet.....	20
1.7.1. GM-CSF ist ein pluripotenter Faktor, der eine Vielzahl von Zellen zur Differenzierung und Reifung anregt	20
1.7.2. TNF- α wird von verschiedenen Zellen produziert und dient der Vermittlung einer Entzündungsreaktion	20
1.7.3. SCF wirkt als Wachstumsfaktor für verschiedene Leukozyten	21
1.7.4. M-CSF ermöglicht das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung von Monozyten, Makrophagen und deren Vorläuferzellen	22

1.7.5. Interleukin-4 wird von TH2-Zellen produziert und induziert eine Reihe von Wachstums- und Reifungsvorgängen	23
1.8. Die Oberflächenmarker CD1c, CD303, CD141 und CD304 werden von verschiedenen Subpopulationen dendritischer Zellen exprimiert. 24	
1.8.1. CD1c wird von myeloiden dendritischen Zellen exprimiert	24
1.8.2. CD141 wird myeloiden dendritischen Zellen zugeordnet	24
1.8.3. Der Oberflächenmarker CD303 wird auf plasmazytoiden dendritischen Zellen gefunden	25
1.8.4. CD304 (NP-1) ist ein Oberflächenmarker plasmazytoider dendritischer Zellen .	26
1.9. Die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit	27
1.9.1. Die Ausgangssituation: Die neuen Marker waren bereits an PBMC-DC beobachtet worden	27
1.9.2. Die Aufgabenstellung: Der Nachweis der Expression der Oberflächenmarker CD1c, CD141, CD303 und CD304 (NP-1) bei myeloiden dendritischen Zellen und Makrophagen aus CD34+-Nabelschnurblut-Stammzellen	27
2. Material und Methodik	29
2.1. Die Versuche erfolgten an aus Nabelschnurblut isolierten CD133+ hämatopoetischen Vorläuferzellen	29
2.2. Die Sortierung der CD133+-Zellen aus dem Nabelschnurblut erfolgte in mehreren Schritten.....	29
2.2.1. Zuerst war die Gewinnung der mononukleären Zellen aus dem Gesamtblut erforderlich.....	29
2.3. Die Sortierung der gesuchten CD133+Zellen wurde an der MiniMACS-Säule durchgeführt	31
2.3.1. Die Grundlagen der MACS-Sortierung:	31
2.3.2. Die Durchführung der MACS-Sortierung	32
2.4. Die Kultivierung der gewonnenen Zellen erfolgte für die ersten sieben Tage für alle gewünschten Zellarten gleich	34
2.4.1. Die CD133+Zellen wurden in Kulturmedium mit spezifischen Zytokinen beimpft	34
2.4.2. Die Nachstimulation der Kulturen der drei zu vergleichenden Zellarten erfolgte mit unterschiedlichen Zytokinen	34
2.5. Die FACS-Analyse diente der Erkennung der Oberflächenmarker -Expression bei den unterschiedlich kultivierten Zellen	36
2.5.1. Grundlagen.....	36
2.5.1.1. Die Anfärbung der Oberflächenantigene zur Bestimmung ihrer Expression in Bezug auf die interessierenden Zelltypen	36
2.5.1.2. Der Aufbau eines Durchflußzytometers	36
2.5.1.3. Die Messung der Lichtstreuung und der Fluoreszenz	37
2.5.1.4. Die Signalverarbeitung und Datenauswertung	38
2.5.1.5. Die Autofluoreszenz und Qualitätskontrolle	38
2.5.2. Die Durchführung der durchflußzytometrischen Messungen an den zu vergleichenden drei Zellarten	38

3. Ergebnisse	44
3.1. Beobachtungen während der Kultivierung der CD133+-Zellen aus Nabelschnurblut	44
3.1.1. Für die Gewinnung von Vorläufern myeloider dendritischer Zellen wurden die CD133+-hämatopoetischen Stammzellen mit SCF, TNF-a und GM-CSF nachstimuliert.....	44
3.1.2. Zur Differenzierung reifer dendritischer Zellen wurde den Kulturen IL-4, TNF-a und GM-CSF zugesetzt	45
3.1.3. Zur Überprüfung der spezifischen Marker für dendritische Zellen wurden weitere Kulturen mit M-CSF zur Anzucht von Makrophagen versetzt	47
3.2. Die Expression von CD1c, CD141, CD303 und CD304 auf stammzellgenerierten dendritischen Zellen	48
3.2.1. Der auf myeloiden dendritischen Zellen zu erwartende Oberflächenmarker CD1c.....	48
3.2.2. Eine CD141-Expression war nur bei wenigen Zellen zu beobachten.....	50
3.2.3. Der Oberflächenmarker CD303	52
3.2.4. Der Oberflächenmarker CD304 wurde ubiquitär exprimiert	54
3.3. Die Expression der neuen Oberflächenmarker auf den CLA+-Zellen der Kulturen.....	58
3.4. Tabellarische Zusammenfassung der Beobachtungsergebnisse für CD1c, CD141, CD303 und CD304 an myeloiden dendritischen Zellen aus Nabelschnurblut-Stammzellen	62
4. Diskussion	63
4.0.1. CD1c wird von myeloiden dendritischen Zellen exprimiert	64
4.0.2. Die CD141-Expression konnte für myeloide dendritische Zellen bestätigt werden	64
4.0.3. Die CD303-Expression auf stammzellgenerierten dendritischen Zellen war gering	65
4.0.4. Die CD304-Expression auf aus Nabelschnurblutstammzellen angezüchteten dendritischen Zellen war ubiquitär verteilt.....	67
4.1. Die Expression der vier Oberflächenmoleküle durch Makrophagen	68
4.2. Die Expression von CD1c, CD141, CD303 und CD304 auf CLA+-Zellen.....	68
4.3. Zusammenfassung	69
5. Literaturverzeichnis	72
Danksagung	85

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb:	Abbildung
Ag:	Antigen
Ak:	Antikörper (auch Ab: Antibody)
APC:	Antigenpräsentierende Zelle
CBMC:	Cord Blood Mononuclear Cells (Mononukleäre Nabelschnurblutzellen)
CD:	Cluster of Differentiation (Oberflächenantigen)
CFU:	colony forming unit (G: Granulocyte, GM: Granulocyte/ Makrophage, E: Erythrocyte, Meg: Megakaryocyte)
CLA:	Cutaneuos Lymphocyte Antigen
CLP:	Common Lymphoid Precursor
CMP:	Common Myeloid Precursor
CTL:	Zytotoxischer T-Lymphozyt
d:	Tag
DC:	Dendritische Zelle
FCS:	Fetal Calf Serum (fetales Kälberserum)
FITC:	Fluoresceinisothiocyanat
g:	Gravitationskonstante
GC-DC:	Germinal center DC (Keimzentrum-DC)
GM-CSF:	Granulocyte-colony stimulating factor (Granulocyten- Makrophagen-koloniestimulierender Faktor)
HANKS:	Hanks balanced salt solution, steril
HBSS:	Hanks balanced salt solution
Hepes:	2-(N-Hydroxyethylpiperazil)-2'Ethansulfonsäure
HPC:	Hematopoetic Progenitor Cell (Hämatopoetische Vorläuferzelle)
ICAM:	Intracellular adhesion molecule
IDC:	Interdigierende Dendritische Zelle
IFN:	Interferon
intDC:	Interstitielle DC

IL:	Interleukin
LC:	Langerhanszelle
LFA:	Leukocyte functional antigen
MACS:	Magnet associated cell sorting
M-CSF:	Makrophage-colony stimulating factor (Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor)
MHC:	Major Histocompatibility Complex (Haupt-Histokompatibilitätskomplex)
MicroBead:	Paramagnetisch markierte Antikörper
MLR:	Mixed Leucocyte Reaction (gemischte Leukozytenreaktion)
Mo:	Monozyten
M ϕ :	Makrophagen
NK:	Natürliche Killerzellen
PB:	Peripheres Blut
PBMC:	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PE:	Phycoerythrin
SCF:	Stammzellfaktor (auch c-Kit-Ligand, steel factor)
Tab:	Tabelle
TAP:	Transporters associated with antigen processing
TCR:	T-Zell-Rezeptor
TNF- α :	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
Tricolor:	Kombinierter R-Phycoerythrin-Cyanin(Cy5)-Farbstoff

1. Einleitung

1.1. Das humane Immunsystem hat angeborene und erworbene Eigenschaften

Im Laufe der Evolution haben sich in lebenden Organismen äußerst komplexe Systeme zum Schutz vor schädlichen chemischen, physikalischen und belebten äußeren Einflüssen entwickelt. Diese Immunabwehr hängt von einem Zusammenspiel angeborener Antigen-unspezifischer sowie adaptiver antigenspezifischer Immunität ab. Zu den Hauptmerkmalen des angeborenen Immunsystems des Menschen werden unter anderem die Fähigkeiten gerechnet, pathogene Faktoren und/oder Gewebsverletzungen schnell zu erkennen und die gegenwärtige Gefahr den Zellen der adaptiven Immunabwehr schnell zu signalisieren.

Das angeborene Immunsystem besteht aus phagozytotischen Zellen, natürlichen Killerzellen (NK) und löslichen Faktoren wie Komplement und Interferone (z.B. Interferon- α). Diese Zellen benutzen eine Vielfalt an Mustererkennungsrezeptoren, um Merkmale zu identifizieren, die sich mehrere Pathogene teilen (z.B. bakterielle Lipopolysaccharide, Kohlenhydrate oder doppelsträngige virale RNA).

Der Evolutionsdruck hat zudem zur Ausbildung eines adaptiven Immunsystems geführt. Zu dessen Hauptmerkmalen gehört die Fähigkeit, Gene der Immunglobulinfamilie zu re-arrangieren. Dieses ermöglicht die Ausreifung einer großen Vielfalt an Antigen-spezifischen Klonen, um schließlich die immunologische Erinnerung (durch Memory B- und T-Zellen) aufzubauen. Dieses hochentwickelte und potente System muß jedoch durch antigenpräsentierende Zellen (APC) instruiert und reguliert werden [8]. Dendritische Zellen spielen als antigenpräsentierende Zellen eine ganz besondere Rolle, da sie als einzige in der Lage sind, primäre Immunantworten zu induzieren und dadurch den Aufbau einer „immunologischen Erinnerung“ überhaupt erst ermöglichen.

1.2. Die Definition und Klassifikation der dendritischen Zellen

1.2.1. Die Entdeckung der ersten dendritischen Zellen: die Langerhans-Zellen der Haut

Die dendritischen Zellen (DC) der Epidermis wurden erstmals 1869 von Langerhans beschrieben und später nach ihm benannt (Langerhanszellen (LC)). Daraufhin folgten über lange Zeit weitreichende Spekulationen über ihre Funktion. Daß verwandte Zellen auch in anderen Geweben vorkommen, entdeckten Steinman und Cohn 1973 [46]. Sie enthalten jedoch nicht die für Langerhanszellen typischen, 1961 von Birbeck entdeckten und nach ihm benannten charakteristischen Granula [109].

Heute werden dendritische Zellen als Teil des lymphohämatopoetischen Systems gesehen. Sie repräsentieren eine Population professioneller antigenpräsentierender Zellen mit der Fähigkeit zur Initiierung primärer (und sekundärer) T-Zell-Immunreaktionen [46]. Mittlerweile werden sie und ihre Stamm- und Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, peripherem Blut oder Nabelschnurblut gewonnen. Es sind eine ganze Anzahl von Oberflächenmarkern und anderen phänotypischen und funktionellen Eigenschaften bekannt, die ihre Identifikation erlauben und die weitere Erforschung der Physiologie und des komplexen Funktionssystems dieser Zellen ermöglichen.

1.2.2. Die Namensgebung und Definition der dendritischen Zellen

Die Bezeichnung „dendritische Zelle“ wurde aufgrund ihres bei isolierten Zellen zu beobachtenden Phänotyps 1973 von Steinman geprägt. Sie weisen eine unverwechselbare Morphologie mit zahllosen zytoplasmatischen Fortsätzen auf, die ihnen ein sternartiges Aussehen verleihen. Aufgrund dieser Ausläufer haben dendritische Zellen eine große Oberfläche, die einen direkten Kontakt mit einer großen Anzahl der umgebenden Zellen erlaubt. So bilden dendritische Zellen *in vitro* große sphärische Aggregate mit Lymphozyten. Experimentell wurde nachgewiesen, daß nur eine reife dendritische Zellen erforderlich ist, um 100-3000 T-Zellen zu stimulieren [103]. Die Bezeichnung erfolgte jedoch zuerst rein phänotypisch (gr. dendron = Baum); über ihre Funktion war lange wenig bekannt [29, 99].

Dendritische Zellen weisen sehr verschiedene Eigenschaften auf, die charakteristisch sind für ihren Differenzierungs- und Aktivierungsstatus. Zusätzlich zu ihrer typischen Morphologie haben sie folgende Eigenschaften:

Die einzigartige Fähigkeit reifer dendritischer Zellen, primäre T-Zell-Antworten bzw. eine ausgeprägte „Allo“-MLR (allogene MLR (mixed leukocyte reaction)) zu stimulieren, die der primären Immunreaktion auf exogene Antigene wahrscheinlich entspricht (erfordert die Differenzierung/Aktivierung dendritischer Zellen);

Spontanes initiales und schnelles Clustern mit T-Lymphozyten bei 37 °C *in vitro*;

Deutliche Zellmotilität und die Fähigkeit, spontan bei 37 °C *in vitro* Zellmembranfortsätze auszustrecken und zu retrahieren, durch Gewebe zu wandern und die T-Zell-Regionen der Lymphknoten sicher zu finden;

Spezialisierte phagozytotische Aktivität (*in vitro*); z.B. aktive Makropinozytose;

Ein Zelloberflächen-Phänotyp, der sie von anderen Leukozyten, hauptsächlich Monozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten unterscheidet (spezifische Expressionsmuster);

Die Expression bestimmter Oberflächenmarker in Abhängigkeit vom jeweiligen Differenzierungs-/Aktivierungsstatus (aktivierte Zellen: z.B. CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-3), MHC (Major histocompatibility complex); CD: cluster of differentiation);

Zytochemische Reaktionen, die sie von Monozyten bzw. Makrophagen unterscheiden (z.B. verminderte Aktivität der Myeloperoxidase, Dipeptylpeptidase, Cathepsin B);

Sowie eine hohe Dichte an MHC-II-Antigen [46].

Aufgrund ihrer facettenreichen Entwicklungswege, ihren zahlreichen Kommunikationsschnittpunkten mit anderen Zellen des Immunsystems und teils sogar gegensinniger Beeinflussung dieser ist es äußerst schwierig, dendritische Zellen in eine überschaubare systematische Gliederung zu zwingen. Eine Möglichkeit, dendritische Zellen zu klassifizieren, besteht in der Bezeichnung nach Lokalisation und Phänotyp. So finden sich in nicht-lymphoiden Organen Langerhanszellen und interstitielle dendritische Zellen. „Veiled“ („schleiertragende“) Zellen der afferenten Lymphbahnen und die dendritischen Zellen des Blutes zirkulieren in der Peripherie. In den lymphoiden Organen finden sich schließlich die plasmazytoiden dendritischen sowie die interdigierenden dendritischen Zellen [98].

1.3. Herkunft und Entwicklung dendritischer Zellen

1.3.1. Die Herkunft der dendritischen Zellen

Das Blut stammt dem Mesoderm ab, aus dem unter anderem auch die Blutgefäße und das Nervensystem hervorgehen. Das hämatopoetische System ist jedoch insofern etwas besonderes, als daß es sich nach der Ausbildung der ersten Blutzellen am 18. Tag der Embryonalentwicklung ständig selbst erneuert. So entstehen kontinuierlich während des gesamten Lebens eines Organismus verschiedene Zell-Linien aus einer einzigen Vorläuferzelle. Zu diesen Zell-Linien gehören neben Erythrozyten, den verschiedenen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten auch die dendritischen Zellen. Diese Entwicklungsvorgänge sind äußerst präzise reguliert, jedoch gleichzeitig sehr flexibel und anpassungsfähig. Sobald hämatopoetische Vorläuferzellen (hematopoietic precursor cells, HPC) sich teilen und differenziertere Tochterzellen entstehen, wird ab der zehnten bis fünfzehnten Teilung die genetische Programmierung auf eine bestimmte Entwicklungslinie hin ausgerichtet. Wie die Restriktion der Plastizität dieser Vorläuferzellen auf einen umschriebenen Differenzierungsweg hin im Detail funktioniert, ist noch unbekannt [121].

Dendritische Zellen entstammen hämatopoetischen $CD34^+$ -Stammzellen, die etwa ab der vierten bis sechsten Woche im Embryo nachweisbar sind. Sie finden sich im späteren Leben im Knochenmark. Die hämatopoetische Herkunft dendritischer Zellen wird u.a. durch die Expression des gemeinsamen hämatopoetischen Markermoleküls CD45 (auch „leukocyte common antigen“) unterstrichen. Diese Vorläuferzellen werden als ihre erste Entwicklungsstufe betrachtet. Aus den hämatopoetischen $CD34^+$ -Stammzellen bilden sich unter dem Einfluß verschiedener Faktoren die zirkulierenden Vorläuferzellen der dendritischen Zellen. Zu diesen Faktoren zählen unter anderem GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor), $TNF-\alpha$ (Tumornekrosefaktor alpha), und die Proteinkinase C. Die Anwesenheit des Stammzellfaktors (SCF) kann zu einer Verstärkung des Wachstums der dendritischen Zellen führen, ohne die durch GM-CSF und $TNF-\alpha$ vorgegebene Differenzierung zu verändern.

Die zu einer ersten Differenzierung angeregten Vorläuferzellen wandern in die peripheren Gewebe ein, wo sie als unreife Zellen mit hoher phagozytotischer Kapazität residieren.

Nach z.B. einer Gewebsverletzung nehmen die mittels verschiedener Stimuli aktivierten dendritischen Zellen eingedrungene Antigene auf und wandern daraufhin zu den lymphoiden Organen, wo sie die Immunantwort initiieren. Sie präsentieren ihr aufgenommenes Antigen gegenüber $CD4^{+}$ - und $CD8^{+}$ -T-Zellen, welche ihrerseits die Funktion der Immun-Effektoren, einschließlich der antigenspezifischen $CD8^{+}$ (zytotoxischen) T-Zellen und der B-Zellen, so wie nicht-antigenspezifische Makrophagen, eosinophile Lymphozyten und NK-Zellen regulieren [8].

Die Erforschung der Herkunft und Entwicklung der dendritischen Zellen ist nach wie vor ein spannender Bereich der Immunologie, mit wichtigen Implikationen in Bezug auf ihre Verwendung z.B. in der Tumor-Immuntherapie. Obwohl myeloide und in einem gewissen Ausmaß auch plasmazytoide dendritische Zellen aus Vorläuferzellen unter definierten experimentellen Konditionen angezüchtet werden können, bleiben die Differenzierungswege *in vivo* weiterhin relativ unbekannt. *In vitro* erzielte Ergebnisse können jedoch nicht unbegrenzt auf die *in-vivo*-Situation übertragen werden [1].

1.3.2. Subpopulationen dendritischer Zellen

Lange wurde einfach akzeptiert, daß dendritische Zellen eine spezielle Population antigenpräsentierender Leukozyten mit der ausgeprägten Fähigkeit, primäre T-Zell-Antworten zu induzieren, sind. Doch gibt es zunehmend Beweise, die zeigen, daß das System der dendritischen Zellen viel mehr Plastizität birgt als ursprünglich angenommen. So wurde gezeigt, daß

dendritische Zellen sich aus verschiedenen Arten von Vorläuferzellen entwickeln können (z.B. sind Monozyten, die ihren M-CSF-Rezeptor noch tragen, zur Reifungsinduktion in der Lage. In ihnen besteht vermutlich eine reichhaltige Quelle an Vorläuferzellen, die zu dendritischen Zellen oder Makrophagen differenzieren können [23]);

funktionell verschiedene Arten dendritischer Zellen sich aus demselben Vorläufer entwickeln können; und

mehrere verschiedene Subpopulationen dendritischer Zellen im Blut (Mensch) oder der Milz (Maus) *in vivo* vorhanden sind [40].

Aufgrund unterschiedlicher Entwicklungslokalisationen und -voraussetzungen im Körper sowie den komplexen Funktionen der dendritischen Zellen wird zunehmend versucht, Subpopulationen zu unterscheiden. Die Erkenntnisse dazu wachsen schnell und befinden

sich zudem in einem steten Wandel. So entwickelten sich mehrere fundamental verschiedene Blickweisen auf ihr System. Während z.B. manche Wissenschaftler die Hypothese bevorzugen, daß jede der verschiedenen Arten dendritischer Zellen eine bestimmte immunregulatorische Rolle ausübt, favorisieren andere die Annahme, daß für die Antigenpräsentation primär nur der Aktivations-/Reifungszustand einer dendritischen Zelle von Bedeutung ist, ungeachtet ihrer Herkunft oder Art [40].

Unter den möglichen Differenzierungswegen dendritischer Zellen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks sind bislang mindestens drei verschiedene identifiziert worden. Dendritische Zellen sind nicht homogen, vielmehr handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Zellen, die aus den oben genannten Vorläufern in unterschiedlicher Weise hervorgehen. Die Natur der frühen Vorläuferzellen beeinflusst den Phänotyp der reifen dendritischen Zellen mit, ohne ihn jedoch strikt zu diktieren.

Es sind zwei verschiedene Hauptgruppen dendritischer Zellen bekannt: der plasmazytoide (auch lymphoid genannt) und der myeloide (aus hämatopoetischen $CD34^+$ -Vorläuferzellen oder Blutmonozyten) [67, 89]. Sämtliche unterschiedlichen Populationen dendritischer Zellen, die im Thymus und der Milz der Maus identifiziert worden waren, konnten aus diesen unterschiedlichen Vorläufer-Populationen kultiviert werden. Im humanen Thymus und Knochenmark wurde u.a. ebenfalls eine plasmazytoide Zelle mit der Fähigkeit, sowohl Lymphozyten als auch dendritische Zellen zu hervorbringen, identifiziert. Plasmazytoide dendritische Zellen können sich in Abwesenheit von GM-CSF entwickeln [23, 26, 47, 76, 111, 117].

1.3.2.1. Plasmazytoide dendritische Zellen

Plasmazytoide dendritische Zellen bezeichnen eine Subpopulation, die sich entlang des lymphozytären Differenzierungswegs entwickeln. CLP (common lymphoid precursors) weisen eine plasmazellähnliche Morphologie auf und exprimieren keine myeloiden Marker, jedoch ausgeprägt CD4, CD62L und CD123. Sie entwickeln sich wahrscheinlich aus Vorläufern des Thymus und finden sich in den T-Zell-Arealen sekundärer lymphatischer Gewebe. Sie bringen (bei der Maus) entsprechende Zellzahlen an $CD4^-CD8\alpha^+$ - und $CD4^+CD8\alpha^-$ -dendritischen Zellen hervor und sezernieren Interferon- α . Im menschlichen Knochenmark sind Vorläuferzellen identifiziert worden, die T-, B-, NK- und plasmazytoide dendritische Zellen hervorbringen, jedoch keine myeloiden Zellarten.

Plasmazytoide dendritische Zellen aktivieren besonders die TH₂-Immunantwort. Sie haben zudem die Fähigkeit, die Apoptose zu induzieren und spielen eine Rolle bei der Elimination potentiell autoreaktiver T-Zellen (zentrale und periphere Toleranz). Daher wird ihnen zugesprochen, in erster Linie regulatorische statt stimulatorische Funktionen auf Immuneffekte auszuüben [52, 80, 89, 108].

1.3.2.2. Myeloide dendritische Zellen

Myeloide Vorläuferzellen sind Vorstufen der Granulozyten und Makrophagen des Immunsystems. Untersuchungen zeigen zwei weitere Entwicklungspfade dendritischer Zellen, von denen beide mit einer myeloiden Abstammung assoziiert sind. CMP (common myeloid precursors) sind gemeinsame myeloide Vorläuferzellen. Für sie ist eine ausgeprägte Interleukin-12-Sekretion charakteristisch. In menschlichem Knochenmark finden sich gleichzeitig Kolonien aus rein dendritischen Zellen sowie gemischte dendritische/Makrophagen-Zelltypen, die ausgeprägt CD1a exprimieren. Kulturen aus peripheren mononukleären Zellen, die mit GM-CSF und Interleukin-4 versetzt wurden, als auch mit GM-CSF, TNF- α und SCF kultivierte dendritische Zellen aus CD34⁺-Vorläuferzellen bringen CD14⁺CD1a⁻ (assoziiert mit interstitiellen und/oder zirkulierenden dendritischen Zellen) und CD14⁻CD1a⁺-Zellpopulationen (verwandt mit epidermalen Langerhanszellen) hervor [22, 52, 80, 89].

Für diese Arbeit wurden ausschließlich myeloide dendritische Zellen aus CD133⁺-(CD34⁺-) Vorläuferzellen mit Hilfe von GM-CSF, TNF- α und SCF kultiviert, zur weiteren Differenzierung stimuliert und beobachtet.

1.3.3. Die Entwicklung und Reifung der dendritischen Zellen

Dendritische Zellen zirkulieren als unreife Vorläuferzellen im Blut. Diese stellen nach den Stammzellen im Knochenmark die zweite Entwicklungsstufe dar, bevor sie in die peripheren Gewebe einwandern. In diesen Geweben findet man dendritische Zellen in unterschiedlichen Reifungsstadien, die sich durch charakteristische Expressionsmuster ihrer Oberflächenmoleküle und spezifische Funktionen auszeichnen.

Der dritte Entwicklungsabschnitt führt zu gewebständigen unreifen dendritischen Zellen. Sie weisen eine hohe endozytotische und phagozytotische Kapazität auf, was die aktive Antigenaufnahme ermöglicht. Nach der Erkennung von Pathogenen und der darauf

folgenden weiteren Differenzierung sezernieren sie große Mengen an Zytokinen (z.B. Interleukin-12), um die Infektionsausbreitung zu limitieren.

Durch aufgenommene Pathogene und inflammatorische Stimuli induziert folgt eine Migration aus der Peripherie über die afferenten Lymphwege. Die vierte Entwicklungsstufe mit reifen dendritischen Zellen findet sich nun in den sekundären lymphoiden Organen. Dort exprimieren sie große Mengen kostimulatorischer Moleküle, welche die an MHC-Moleküle gekoppelte Antigenpräsentation gegenüber T-Zellen ermöglichen und so die Antwort des Immunsystems induzieren.

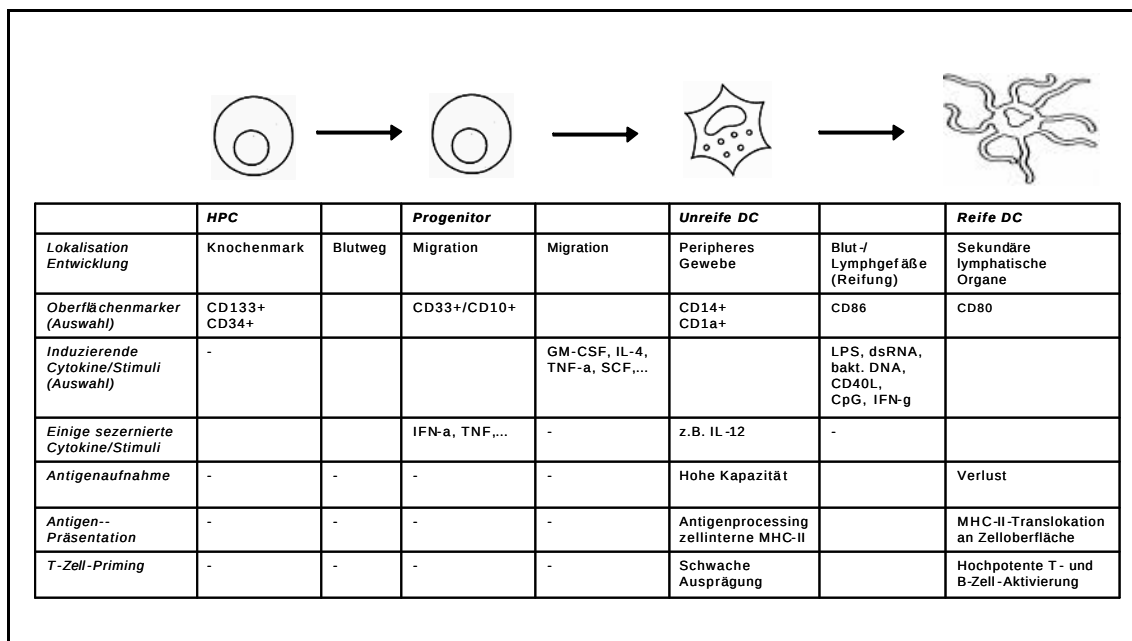


Abbildung 1: Die Entwicklung dendritischer Zellen:

Dendritische Zellen stammen von $CD34^{+}$ -hämatopoetischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark. Abhängig von Rezeptorstatus und Umgebungseinflüssen entstehen plasmazytoide oder myeloide Vorläuferzellpopulationen. Letztere wandern in peripheres Gewebe zur Antigenaufnahme ein. Durch Pathogene, Zytokine etc. aktiviert wandern sie über Blut- und afferente Lymphwege in die sekundären lymphatischen Organe, um als reife dendritische Zellen gegenüber T-Zellen die verarbeiteten Antigene mittels MHC-Molekülen zu präsentieren.

1.4. Funktionen dendritischer Zellen

Dendritische Zellen bilden ein komplexes Zellsystem, welches unter verschiedenen Umgebungsbedingungen so grundverschiedene Zustände wie Immunität und Toleranz induzieren kann. Sie sind zudem in komplexe Stimulations- und Regulationsmechanismen bezüglich der B-Zell-Proliferation und Differenzierung der T-Zellen zu Typ I oder II eingebunden [8, 89, 105].

Die sich aus den CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen entwickelnden dendritischen Zellen sind professionelle antigenpräsentierende Zellen. Das von ihnen ausgebildete Netzwerk befindet sich in

verschiedenen Zonen nicht-lymphoiden Gewebes, z.B. die Langerhanszellen der Epithelien (Haut, Schleimhäute, Lunge) und die interstitiellen dendritischen Zellen in Herz, Nieren und anderen Organen;

Blut und Lymphflüssigkeit, einschließlich der „schleiertragenden“ („veiled“) Zellen der afferenten lymphatischen Wege und der peripheren dendritischen Zellen;

der T-Zell-reichen Zone sekundärer plasmazytoider Gewebe (dort die sogenannten interdigierenden Zellen (IDC)) und der Randzonen der Milz;

dem Thymusmark; und

den B-Follikeln der sekundären lymphatischen Gewebe, (hier die sogenannten Keimzentrum-DC (GCDC, germinal center DC)).

Obwohl die Beziehungen zwischen diesen Populationen noch nicht vollständig verstanden sind, werden sie als verschiedene Differenzierungswege und Reifungsgrade repräsentierend und durch präzise geregelte Kreisläufe verbunden betrachtet [19].

1.4.1. Eigenschaften unreifer dendritischer Zellen

1.4.1.1. Die Antigen-Aufnahme erfolgt mit unterschiedlichen Mechanismen und erfordert Cofaktoren

Weniger differenzierte oder unreife dendritische Zellen phagozytieren selektiv und können effizient eine große Bandbreite an Antigenen zur Verarbeitung und Verknüpfung mit MHC-II-Molekülen internalisieren. Sie sind durch eine hohe endozytotische Aktivität ausgezeichnet, welche sich durch eine geringere Phagozytosefähigkeit als Makrophagen,

jedoch ein hohes Maß an konstitutiver Makropinozytosefähigkeit auszeichnet. Sie nehmen Bestandteile von Viren, Bakterien und intrazellulären Parasiten auf. Auch erfolgt die Internalisation peptidbeladener Heat-shock-Proteine. Während der späteren Reifung gehen diese Eigenschaften verloren [8, 23].

1.4.1.2. Die Mechanismen der Antigenaufnahme sind vielfältig

Der Mannoserezeptor:

Der Mannoserezeptor ermöglicht wie die Rezeptoren für Immunglobuline (CD64 (FcγI), CD32 (FcγRII)) die effiziente Aufnahme von IgG-Immunkomplexen und mannosylierten Antigenen. Er enthält zahlreiche kohlenhydratbindende Domänen und steuert die Endozytose bzw. Phagozytose unterschiedlichster Mannose- oder Fucosereste tragender Antigene. Im Gegensatz zu den Fc-Rezeptoren und den membranständigen Immunglobulinen, welche zusammen mit dem gebundenen Antigen abgebaut werden, löst sich der Mannoserezeptor von dem gebundenen Antigen bei einem endosomalem pH von 5.9-6.0 und re-zirkuliert zur Plasmamembran. Durch diesen Kreislauf der Ligandenbindung und Internalisation garantiert er eine gleichbleibend hohe Antigen-Aufnahmekapazität.

Mannosylierte Proteine werden schnell internalisiert und selektiv dem „MHC-Klasse-II-Verarbeitungsweg“ zugeführt. Diese Proteine werden mit 100fach höherer Effizienz als unglykosylierte Proteine von dendritischen Zellen präsentiert. In dendritischen Zellen findet man den Mannoserezeptor nicht gleichzeitig mit einer hohen Expression von MHC-II-Molekülen (Major Histocompatibility Complex), welche spätere Reifungsstadien charakterisieren. Mannosylierung repräsentiert einen sehr effektiven Weg, Antigene *in vivo* durch dendritischen Zellen präsentieren zu lassen [8,23].

Toll-like Rezeptoren (TLR):

Toll-like Rezeptoren werden von myeloiden Zellen wie Makrophagen, dendritischen und bestimmten endothelialen Zellen exprimiert. Die Bindung erkannter Pathogene an einen solchen Rezeptor führt zur Sekretion von Zytokinen wie Interleukin-12 und TNF-α durch die rezeptortragenden Phagozyten.

TLR spielen eine wichtigen Rolle in der Aufnahme und Beseitigung von Komponenten wie z.B. modifizierten Wirtsmolekülen und apoptotischen Zellen. Durch die Vermittlung verschiedener Mechanismen wie Endozytose, Phagozytose und Adhäsion führen sie zur Bindung und Internalisation von Mikroorganismen und ihren Produkten, einschließlich grampositiver (Lipoteichonsäure), gramnegativer (Lipopolysaccharide (LPS)) und intra-

zellulärer Bakterien sowie bakterieller DNA. Zusätzlich erkennen Scavenger-Rezeptoren neben modifiziertem LDL (wodurch er sicherlich eine Rolle bei der Atheroskleroseentstehung spielt) eine große Bandbreite von Liganden, einschließlich Polysacchariden und Polyribonucleinsäuren [79, 119,120].

Die Aquaporine:

Unreife dendritische Zellen nehmen stetig große Flüssigkeitsvolumina mittels Makropinozytose auf und konzentrieren diese Flüssigkeit in ihren endozytotischen Kompartimenten. Dieser Konzentrationsmechanismus stellt die Grundlage ihrer hohen Präsentationskapazität für lösliches Antigen dar und erfordert die Fähigkeit eines schnellen Wasseraustausches über die Zellmembran. Die von unreifen dendritischen Zellen exprimierten Aquaporine stellen somit ein essentielles Element der Volumenkontrollmechanismen dar. Nach der Reifung der dendritischen Zellen werden sie, wie am Beispiel der Moleküle AQP3 und AQP7 experimentell gezeigt, herunterreguliert [6].

1.4.2. Die Reifung dendritischer Zellen erfolgt nach Kontakt mit Pathogenen oder inflammatorischen Stimuli und führt zu veränderten Funktionen

Die Induktion der Reifung wird nicht primär durch die Antigenaufnahme, sondern erst durch den Kontakt mit Pathogenen, bakteriellen Produkten und Komponenten der Bakterienwand oder inflammatorischen Stimuli (z.B. LPS, CD40-L, TNF- α , Interleukin-1), Heat-shock-Proteinen, viralen Produkten (z.B. dsRNA) o.a. induziert [23, 107, 115]. Auch T-Helfer-Zellen (CD4⁺-Zellen) können z.B. eine vollständige Reifung der dendritischen Zellen mittels CD40/CD40L-abhängiger und -unabhängiger Interaktionen triggern [107].

Arbeiten der frühen 1990er Jahre wiesen bereits nach, daß frische Langerhans-Zellen in der *in-vitro*-Kultur ihre Antigenbindungs-, Verarbeitungs- und MHC-II-Synthesefähigkeit sowie ihre aziden Organellen verlieren und zu immunstimulatorischen dendritischen Zellen reifen. Diese Veränderungen zeigen deutliche Parallelen zu denen, welche *in vivo* stattfinden, wenn Langerhanszellen von der Epidermis zu den abführenden LK wandern. [23].

Der Reifungsprozeß während der Migration von der Peripherie zu den primären lymphatischen Organen ist mit mehreren koordinierten Vorgängen, phänotypischen und funktion-

nellen Veränderungen assoziiert. Diese schließen den Verlust der endozytotischen und phagozytotischen Rezeptoren und somit den Verlust der Antigenaufnahme- und Verarbeitungsfähigkeit mit ein. Zudem erfolgt eine Hochregulation akzessorischer und costimulatorischer Moleküle wie CD40, CD58, CD80 und CD86. Veränderungen der Morphologie, Verschiebungen in den lysosomalen Kompartimenten mit dem Verlust von Monozytenmarkern wie CD68 und der Steigerung von Lysosom-assoziiertem Membranprotein der dendritischen Zellen (DC-LAMP) sowie Veränderung der Klasse-II-Kompartimente sind die Folge. Es resultiert der Phänotyp der reifen dendritischen Zellen mit dem entsprechenden ausgeprägten Rearrangement des Zytoskeletts, der typischen Morphologie der langen Dendriten und einer gesteigerten Motilität, die die Zellmigration fördert [19, 23, 107].

1.4.2.1. Die MHC-Moleküle sind wichtig für die Verarbeitung und Präsentation der Antigene

Unreife dendritische Zellen (wie z.B. frisch isolierte Langerhanszellen), sind dazu in der Lage, effizient native Proteine aufzunehmen und verarbeitete Peptide den Memory-T-Zellen (MTC) zu präsentieren. Im Gegensatz dazu sind kultivierte Langerhanszellen und die interdigitierenden dendritischen Zellen (IDC) der lymphatischen Organe relativ ineffizient in der Antigenaufnahme, obwohl sie eine bemerkenswerte Fähigkeit zur Aktivierung naiver T-Zellen besitzen.

In diesem Kontext exprimieren epidermale, unreife Langerhanszellen weniger MHC-II-Antigene und akzessorische Moleküle als kultivierte Langerhanszellen und interdigitierende dendritische Zellen. Die Reifung der Langerhanszellen, wie sie *in vitro* beobachtet wird, wird als den physiologischen Abläufen sehr ähnlich betrachtet, die während der *in vivo*-Migration der Langerhanszellen von der Haut zu den abführenden Lymphknoten stattfinden [19].

Dendritische Zellen, die z.B. aus Monozyten mit Hilfe von GM-CSF und Interleukin-4 angezüchtet wurden, haben die Eigenschaften unreifer dendritischer Zellen, da sie eine hohe endozytotische Aktivität, aber nur geringe T-Zell-stimulatorische Eigenschaften aufweisen. Diese Zellen exprimieren relativ wenige MHC-II-Moleküle an ihrer Oberfläche, welche außerdem schnell internalisiert werden und durch einen großen intrazellulären Pool rezirkulieren. Teil dieses Pools sind auch die späten Endosomen und Lysosomen, in denen das internalisierte Protein-Antigen verarbeitet wird. Dendritische Zellen regulie-

ren in diesen MHC-II-reichen Zellkompartimenten die initiale intrazelluläre Formation von MHC-II-Peptidkomplexen. Dort bilden sich diese Komplexe jedoch erst, wenn die Zellen zusätzlich inflammatorischen Mediatoren wie z.B. TNF- α , CD40L, Interleukin-1 oder LPS ausgesetzt sind. Das hohe Ausmaß an Klasse-II-Internalisation und Rezirkulation scheint somit für die Funktion unreifer dendritischer Zellen charakteristisch zu sein [23].

Während ihrer letztendlichen Differenzierung, Reifung und dem Verlust der Antigen-Aufnahmefähigkeit verlagern dendritische Zellen ihre MHC-II-Produkte von den intrazellulären Kompartimenten zur Plasmamembran. So erfolgt eine koordinierte Regulation der MHC-II-Moleküle im Sinne eines schnellen und vorübergehenden Anstiegs ihrer Synthese und der Halbwertszeit der Peptid-MHC-Antigen-Komplexe, sowie der MHC-Translokation an die Zelloberfläche. Hierbei vervierfacht sich die Anzahl der oberflächenständigen Klasse-II-Moleküle innerhalb von 24 Stunden als Konsequenz der reduzierten Internalisation und der gesteigerten Biosynthese. Auf diese Weise können dendritische Zellen rasch nach der Exposition mit einem inflammatorischen Stimulus viele Antigen-Peptide präsentieren. Diese Veränderungen sind u.a. die Ursache der Unterschiede zwischen den unreifen dendritischen Zellen nicht-lymphoider Organe (z.B. Langerhanszellen) und den reifen dendritischen Zellen der lymphoiden Organe (z.B. interdigitierende dendritische Zellen) [19, 23, 48, 98].

1.4.2.2. Wechselseitige Interaktionen von dendritischen Zellen und T-Zellen

Ein wesentlicher Faktor für eine adäquate Immunantwort ist die Stimulation unterschiedlicher T-Zell-Subpopulationen. Innerhalb der CD4⁺- und CD8⁺-Subpopulationen (T-Helfer- bzw. zytotoxische T-Zellen) können weitere Unterscheidungen getroffen werden. Professionelle antigenpräsentierende Zellen wirken mit Hilfe von Zytokinen wie Interleukin-12 während eines frühen Priming-Stadiums je nach Anforderung der Situation darauf ein, ob naive T-Zellen zu TH₁- oder TH₂-Zellen werden. So bestimmen sie die Art der T-Zell-vermittelten Immunantwort [64, 81].

Dendritische Zellen können unter den entsprechenden Umgebungsbedingungen aus unpolarisierten TH₀-Zellen jeweils TH₁-, TH₂- oder TH₃-Zellen aktivieren [80]. Die durch die Vermittlung spezifischer dendritischer Zellen polarisierten T-Zellen exprimieren jeweils eine charakteristische Auswahl an Chemokinrezeptoren, die ihre Reaktionen auf die

verschiedenen Induktions- oder Inhibitionsfaktoren bestimmen [80, 122]. Mittels Interleukin-12-, Interleukin-18- oder Interferon- α -Sekretion induzieren dendritische Zellen eine TH₁-Antwort. TH₁-Lymphozyten erkennen durch Makrophagen präsentierte Antigene. Sie führen primär zu einer Aktivierung und Verstärkung der zellvermittelten Immunität, indem sie Zytokine wie Interleukin-2, Interleukin-12, Interferon- γ , Lymphotoxin und TNF- β produzieren. Ein Zusammenspiel dieser Zytokine führt zu einer CD8⁺-Zellproliferation und der Differenzierung zu zytotoxischen T-Zellen. Diese sind in der Lage, infizierte Wirtszellen und veränderte Zellen zu zerstören und zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen zu aktivieren. Außerdem fördern sie die Replikation von CD4⁺-Lymphozyten, regen Makrophagen zur Zerstörung intrazellulärer Pathogene an und induzieren die Produktion opsonierender und komplementaktivierender Antikörper für eine verstärkte Bindung während der Phagozytose. Sie aktivieren neutrophile Granulozyten, fördern die Monozytenproduktion im Knochenmark, aktivieren Adhäsionsmoleküle während der Diapedese und wirken im Rahmen der Chemoattraktion auf Phagozyten [122].

Dendritische Zellen können auch eine Interleukin-4-Sekretion durch T-Zellen induzieren, was zur Auslösung einer TH₂-Antwort führt. TH₂-Lymphozyten erkennen Antigene, welche von B-Lymphozyten präsentiert werden. Sie produzieren Zytokine wie Interleukin-2, -4, -5, -10 und -13. Diese Zytokine ermöglichen aktivierten B-Lymphozyten zu proliferieren und stimulieren deren Antikörperproduktion. Ihre Differenzierung zu antikörpersezernierenden Plasmazellen und die Fähigkeit, die Klasse der produzierten Antikörper zu wechseln, wird gefördert. Eine weitere wichtige Funktion der von den TH₂-Zellen produzierten Zytokine ist es, die Produktion größerer Mengen an IgE (gegen Helminthen und Arthropoden) zu ermöglichen und die Eosinophilie (humorale, allergische und antiinflammatorische Antworten) zu fördern. IgE wirkt als opsonierender Antikörper, welcher die Adhäsion phagozytierender eosinophiler Granulozyten an Helminthen zum Zweck der extrazellulären Zerstörung fördert [64, 81, 122].

Regulatorische T-Zellen, auch T_{reg}-Zellen genannt, stellen eine Gruppe unterschiedlicher natürlicher und induzierter T-Zellen dar. Werden T_{reg}-Zellen durch dendritische Zellen in antigenspezifischer Weise aktiviert, sezernieren sie Interleukin-10. Interleukin-10 inhibiert daraufhin gleichzeitig Immunreaktionen gegen das initiale Antigen sowie auch unspezifisch gegen andere Antigene. Die TH₃-Zellen sind unter den T_{reg}-Zellen wohl am Besten untersucht. Ihr Wirkmechanismus wird antigenunspezifisch über TGF- β vermit-

telt, wobei sie moderate Mengen an Interleukin-10 sezernieren. Sie supprimieren sowohl die TH₁- als auch TH₂-Aktivierung, wobei besonders die Unterdrückung autoimmuner Reaktionen mehrfach beschrieben ist [12].

Lange Zeit wurde die Interaktion zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen als eine nur in einer Richtung verlaufende Interaktion betrachtet. Es zeigt sich jedoch, daß T-Zellen umgekehrt auch eine wichtige Rolle bei der Aktivierung dendritischer Zellen spielen könnten [101]. So führt die Bindung von T-Zellen an das von dendritischen Zellen exprimierte CD40 zu einer Steigerung der Lebensfähigkeit dieser dendritischen Zellen und induziert ihre Reifung. CD40 ist ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie, das auf verschiedenen hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen vorhanden ist. CD40-aktivierte Nabelschnurblut-CD34⁺-Vorläuferzellen proliferieren und differenzieren unabhängig von GM-CSF zu einer Zellpopulation mit Attributen dendritischer Zellen, einschließlich der Stimulation allogener naiver T-Zellen. [57].

Dendritische Zellen können Interleukin-12 produzieren, welches ein Schlüsselzytokin der Induktion von TH₁-Antworten darstellt. CD40L (der TH₁-Zellen) induziert selektiv und ausgeprägt die Interleukin-12-Produktion der dendritischen Zellen. Die Tatsache, daß diese sehr wahrscheinlich auf eine ähnliche Art und Weise wiederum Interleukin-12 gegenüber T-Zellen sezernieren, macht diese Interleukin-12-Quelle besonders effektiv.

Auch die Inhibition der Funktion dendritischer Zellen ist in einigen Veröffentlichungen beschrieben. Interleukin-10 kann ihre Apoptose induzieren und gleichzeitig sowohl ihre T-Zell-stimulatorische Kapazität als auch die Interleukin-12-Produktion erhöhen. Glukokortikoide können ebenfalls ihre Lebensfähigkeit wie auch die Expression costimulatorischer Moleküle verringern. Auch Prostaglandin-E₂ vermindert die Produktion von Interleukin-12, sodaß TH₂-Antworten gefördert werden [23].

1.5. Die Verwendung von dendritischen Zellen in der aktuellen Forschung, Diagnostik und Therapie

Das Wissen um die Aktionsmechanismen dendritischer Zellen ist wichtig für das Verständnis der T-Zell-Aktivierungswege. Es könnte in Zukunft eine Intervention während der Initiierungsphase von Immunantworten erlauben, z.B. im Sinne einer negativen Regulation bei autoimmunen Reaktionen und Transplantationen oder einer positiven Regulation im Falle infektiöser oder neoplastischer Erkrankungen. Dendritische Zellen sind Zielzellen für Viren wie HIV, HTLV-1, Masern, Influenza und Hepatitis, und könnten daher bei der Virusverteilung und der generellen Immunsuppression involviert sein. Daher könnte die zunehmende Aufklärung der Physiologie dendritischer Zellen durchaus Auswirkungen auf die Bekämpfungsstrategien bei viralen Infektionen haben [19].

Dendritische Zellen werden schon seit geraumer Zeit mit vielversprechenden Ergebnissen in Bezug auf Immunotherapie bei Tumoren [43, 44] und bei der Stammzelltransplantation untersucht. Reddy et al. zeigten 2004, daß eine verminderte Anzahl dendritischer Zellen im peripheren Blut mit einer erhöhten Inzidenz von Graft-versus-host-Reaktionen und umgekehrt assoziiert ist [84, 72, 73].

Die Verfügbarkeit *in vitro* kultivierbarer dendritischer Zellen hat neue Forschungsmöglichkeiten zur Immunisierung eröffnet, besonders in Bezug auf die Induktion zytotoxischer Antworten gegen Tumorantigene. Mehrere Tiermodellstudien haben gezeigt, daß dieser Ansatz Effektivität verspricht. Nachdem Mäuse mit dendritischen Zellen beimpft worden waren, die zuvor mit synthetischen Peptiden von Tumor-Zelllinien und sogar inaktiven löslichen Peptiden aktiviert wurden, entwickelten sie protektive Antworten gegen die Tumoren. Dendritische Zellen können auch mit relevanten Genen mittels Expressionsvektoren, nackter DNA oder RNA transfiziert werden [15, 74, 86, 102].

Beim Menschen wird bereits in Pilotstudien die Verwendung dendritischer Zellen als Adjuvanten zur Immunogenität getestet [23, 28]. Es ist entscheidend, die beste Quelle, die optimalen Konditionen und den geeigneten Zeitpunkt zur Aktivierung dendritischer Zellen herauszufinden. Von Bedeutung ist auch, ob die Zugabe von T-Helfer-Epitopen ihre Immunogenität durch Förderung der Aktivierung mittels Memory-T-Zellen noch erhöht. So gibt es z.B. schon klinische Versuche mit Melanompatienten, bei denen mittels GM-CSF und Interleukin-4 differenzierte dendritische Zellen eingesetzt werden [23].

1.6. Zur Identifizierung wurden spezifische Oberflächenmoleküle betrachtet

Bei den in dieser Arbeit vorgestellten Versuchen wurden die jeweiligen Zellen nach der Gewinnung aus dem Nabelschnurblut sowie nach erfolgter Anzucht anhand bekannter Oberflächenmarker charakterisiert und bestimmten Entwicklungslinien und -Stadien zugeordnet. Dafür wurden die Marker CD1a, CD14, CD133 und CLA ausgewählt, die im Folgenden vorgestellt werden.

1.6.1. Die Oberflächenmarker CD34 und CD133 identifizieren hämatopoetische Vorläuferzellen

Bei dem Oberflächenantigen CD34 handelt es sich um ein stadienspezifisches Antigen, welches mit primitiven hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen assoziiert ist. Es handelt sich um ein 105 - 120 kDa großes Typ-1-Transmembran-Sialomucin. Dieses findet sich z.B. auf hämatopoetischen Vorläuferzellen, kapillaren Endothelzellen und Fibroblasten während der Embryogenese. CD34 dient der Zelladhäsion.

Die CD34-Dichte ist auf frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen (im Knochenmark und fetalen Blut) am höchsten und sinkt progressiv während der Zellreifung. Dieses Oberflächenantigen ist ein zuverlässiger Stammzellmarker und wird als solcher zur Identifikation und Selektion genutzt. CD34⁺⁺⁺-Zellen sind frühe, multipotente Vorläuferzellen, die sich in Abhängigkeit verschiedenster Stimuli zu allen Zellen des hämatopoetischen Systems entwickeln können. Voll differenzierte hämatopoetische Zellen sind CD34⁻ [114].

CD133 identifiziert ein 5-Transmembran-Molekül mit einem Molekulargewicht von 120 kDa. Die Expression ist auf primitive Vorläuferzellen einschließlich CD34⁺⁺⁺ hämatopoetischen Stammzellen und Vorläuferzellen beschränkt. Im hämatopoetischen System ist es auf CD34⁺⁺⁺ Stammzellen in humaner fetaler Leber, Blut und Knochenmark, fetalen neuralen Stammzellen, endothelialen Vorläuferzellen und sich entwickelndem Epithel in den Mikrovilli und anderen Plasmamembranprotrusionen konzentriert gefunden worden [82]. Stammzellen lassen sich mit CD133-Antikörpern markieren und können so mittels Durchflußzytometrie oder magnetaktivierter Zellsortierung isoliert werden [114].

1.6.2. CD1a wird von reifen, polarisierten myeloiden dendritischen Zellen exprimiert

Antigene der CD1-Familie (CD1a, -b, -c und -d) gehören zu der Immunglobulin-Superfamilie und werden von kortikalen Thymozyten, dendritischen Zellen, Langerhanszellen, B-Zellen (CD1c), Zellen des Darmepithels, der glatten Muskulatur und der Blutgefäße exprimiert.

CD1a besitzt ein Molekulargewicht von 43-49kd und fungiert als MHC-I-ähnliches Molekül, welches mit dem β_2 -Mikroglobulin assoziiert ist. Es hat möglicherweise eine besondere Bedeutung bei der Antigenpräsentation [5, 50].

Hämatopoetische $CD34^+$ -Vorläuferzellen aus humanem Nabelschnurblut, die mit GM-CSF und TNF- α kultiviert werden, entwickeln sich zu einer gemischten Zellpopulation, die verschiedene Subtypen dendritischer Zellen enthält. Zu einem frühen Zeitpunkt (Kulturtag 5) können besonders zwei Subpopulationen aufgrund ihrer gemeinsamen und ausschließlichen Expression von CD1a und CD14 identifiziert werden. Dieses Merkmal unreifer dendritischer Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit zur Identifikation dieser Zellen genutzt. Beide Subpopulationen reifen am Kulturtag 12 zu typischen dendritischen Zellen [23]. Monozyten, die mit GM-CSF und Interleukin-4 kultiviert werden, differenzieren zu $CD1a^+$ dendritischen Zellen, ohne dabei zu proliferieren [19].

$CD1a^+$ -Vorläuferzellen entwickeln sich zu Zellen, die Birbeck-Granula, das Lag-Antigen und E-Cadherin aufweisen. Sie stellen charakteristische Marker für die Subpopulation der epidermalen Langerhanszellen dar [23].

1.6.3. CD14 wird von monozytoiden Zellen exprimiert

CD14 wird auf myelomonozytären Zellen exprimiert. Es hat ein Molekulargewicht von 53-55 kDa und fungiert als Rezeptor für einen Komplex aus Lipopolysaccharid (LPS) und LPS-bindendem Protein (LBP) [50].

Dieser Oberflächenmarker ist typisch für eine frühe, unreife Entwicklungsstufe monozytoider Zellen, was in der vorliegenden Arbeit genutzt wurde. $CD34^+$ -Stammzellen entwickeln sich zu $CD14^+$ -Vorläuferzellen, die entweder zu Makrophagen (mittels M-CSF, Makrophagen-koloniestimulierender Faktor) oder zu myeloiden dendritischen Zellen (mittels GM-CSF) differenzieren können.

Entsprechend den intermediären CD14⁺-Vorläuferzellen können sich dendritische Zellen in Gegenwart von GM-CSF und Interleukin-4 aus monozytoiden CD14⁺-Zellen aus peripherem Blut entwickeln. Diese sind im Gegensatz zu den CD1a⁺-Zellen weiterhin bipotente Zellen. Mit Hilfe von M-CSF entwickeln sich Makrophagen, bzw. nach Stimulation durch Interleukin-4 und GM-CSF dendritische Zellen. Zellen, die sich aus CD14⁺-Zellen entwickelt haben, werden auch als „myeloide“ dendritische Zellen betrachtet. Es bildet sich eine homogene Population, ohne weitere Teilungen [23, 92].

CD14⁺-Vorläuferzellen reifen u.a. zu CD14⁺CD1a⁺ dendritischen Zellen, denen die Birbeck-Granula, Lag und E-Cadherin fehlen. Jedoch exprimieren sie andere Marker, die für dermale dendritische Zellen charakteristisch sind (CD2, CD9, CD68 und Faktor XIIIa) [23].

1.6.4. CLA, das „Skin-homing molecule“ wird auf aktivierten Leukozyten der Haut gefunden

Die Abkürzung „CLA“ steht für „cutaneous lymphocyte-associated Antigen“. Es handelt sich um eine Tyrosinphosphatase, die eine Voraussetzung für die Antigenrezeptor-vermittelte Aktivierung der T- und B-Zellen darstellt [10, 30]. Diese T-Zellen binden selektiv das „vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1“ (ELAM-1). Diese Interaktion könnte involviert sein in das „skin homing“ der CLA⁺-T-Zellen zu chronisch entzündlichen kutanen Arealen. Hierbei scheint CLA selbst der Rezeptor für ELAM-1 zu sein [14]. CLA wird jedoch in unterschiedlicher Ausprägung von allen hämatopoetischen Zellen, besonders Lymphocyten und somit auch von dendritischen Zellen getragen.

1.7. Zur Anzucht und gezielten Differenzierung der Zielzellen werden bewährte Stimuli verwendet

1.7.1. GM-CSF ist ein pluripotenter Faktor, der eine Vielzahl von Zellen zur Differenzierung und Reifung anregt

Das Zytokin GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor) ist ein azides Glykoprotein mit internen Disulfidbrücken, welches ein Molekulargewicht von 23 kDa aufweist.

Dieses Protein wird von mesenchymalen Zellen im Umfeld hämatopoetisch aktiver und peripherer entzündlich veränderter Areale im Rahmen der Reaktion auf eine Anzahl inflammatorischer Mediatoren produziert.

GM-CSF ist in der Lage, sowohl die Entwicklung von Leukozyten (insbesondere neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, gemischten Granulozyten-Makrophagen-Kolonien und Megakaryozyten aus dem Knochenmark) als auch die Formation eosinophiler Kolonien aus fetalen Leber-Progenitorzellen zu stimulieren. Außerdem fördert GM-CSF einige funktionelle Aktivitäten reifer Granulozyten und Makrophagen [120].

1.7.2. TNF- α wird von verschiedenen Zellen produziert und dient der Vermittlung einer Entzündungsreaktion

TNF- α (Tumor-Nekrosefaktor alpha; auch Cachectin genannt) ist ein membrangebundener Ligand mit einem Molekulargewicht 25 kDa. Es wird von vielen verschiedenen Zellen produziert. Makrophagen stellen, besonders nach dem Kontakt mit Interferon- γ , eine der Hauptquellen dar.

TNF- α löst eine Zytokin-Kaskade aus, die wiederum eine Entzündungsreaktion vermittelt. Die Effekte von TNF- α werden durch zwei Rezeptortypen vermittelt, einen 75 kDa TNF- α -Rezeptor und einen 55 kDa TNF- β -Rezeptor. Es reguliert auf diese Weise die Expression zahlreicher Gene verschiedener Zellarten, die an der Immunantwort bei einer Infektion beteiligt sind [120].

In Assoziation mit GM-CSF induziert TNF- α die Entwicklung dendritischer Zellen. TNF- α verstärkt deutlich die GM-CSF-induzierte Proliferation hämatopoetischer CD34⁺-Vorläuferzellen, die aus Nabelschnurblut oder Knochenmark isoliert wurden. Die Kooperation von TNF- α mit GM-CSF ist *in vitro* ein grundlegender Baustein der Entwicklung dendritischer Zellen aus CD34⁺-Vorläuferzellen [19].

TNF- α beschleunigt die Differenzierung dendritischer Zellen und deren MLR-induzierende Kapazität. Außerdem fördert es im Rahmen der Reifungsinduktion die Verlagerung der MHC-II-Moleküle an die Zelloberfläche [26].

1.7.3. SCF wirkt als Wachstumsfaktor für verschiedene Leukozyten

Der Stammzellfaktor (SCF; auch steel factor oder cKit-L) ist ein membrandurchspannendes Protein, das auf Knochenmark-Stromazellen und in löslicher Form vorkommt. Es wird durch ein Protoonkogen kodiert und durch den cKit-Rezeptor erkannt. Dies ist ein Zelloberflächen-Signalrezeptor, der u.a. auf Leukozyten exprimiert wird, für die SCF einen Wachstumsfaktor darstellt.

Der cKit-Rezeptor ist ein Typ-III-Tyrosinkinaserzeptor, der in die Regulationsmechanismen vieler Zellen und Gewebe involviert ist. Unter anderem ist er essentiell für Hämatopoese, Melanogenese und Fertilität [4, 50, 88, 106].

1985 wurde das cKit-Protein mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers bei humanen, akuten, nicht-lymphoblastischen Leukämien entdeckt. Unter allen hämatopoetischen Zellen ist das Ausmaß der Expression bei den Progenitorzellen, einschließlich 75% der CD34⁺-Zellen am höchsten [4]. Die Effekte von SCF auf hämatopoetische Gewebe beinhalten in Synergie mit anderen Zytokinen, daß es

- ein potenter Wachstumsfaktor für hämatopoetische Vorläuferzellen ist;
- einen Überlebensfaktor für primitive hämatopoetische Vorläuferzellen und NK-Zellen durch Suppression der Apoptose darstellt;
- die Mastzelldifferenzierung, Sekretionsfunktion, Chemotaxis und Adhäsion reguliert,
- das Wachstum der Prä-B-Zellen, frühen Thymozyten, NK-Zellen und erythroiden Kolonien fördert und
- ein Modulator der Zelladhäsion ist [4, 93].

SCF stimuliert sehr frühe Progenitorzellen, die ein großes Proliferationspotential und die Differenzierungsfähigkeit sowohl zu erythroiden, myeloiden, als auch Vorläufern dendritischer Zellen aufweisen. Obwohl SCF allein keinen Effekt auf die Formationen dendritischer Zellkolonien zeigt, fördert es *in vitro* synergistisch mit GM-CSF und TNF sowohl die Zellteilung als auch das Größenwachstum der einzelnen Zellen. Es wirkt direkt auf Vorläuferzellen und kann in Gegenwart von GM-CSF auch ohne TNF ein (suboptimales)

Wachstum dendritischer Zellen induzieren. Die Kombination von z.B. SCF, GM-CSF und TNF- α führt zu einer deutlich ausgeprägten Zunahme der Anzahl immunstimulatorischer CD14⁻HLA-DR⁺ dendritischer Zellen aus definierten CD34⁺-Progenitorzellen des humanem Knochenmarks [4, 88, 106].

Während der Reifung aller hämatopoetischen Zelllinien (außer Mastzellen, die einen hohen Grad der Expression aufrechterhalten) wird cKit herunterreguliert. Periphere Blutzellen sind bis auf wenige Ausnahmen cKit-negativ [4].

Zusätzlich zu den zellspezifischen Regulationsmechanismen wird das Ausmaß der expression von cKit-mRNA und -Protein durch andere Zytokine vermittelt. GM-CSF führt z.B. zu einer Verminderung von cKit-mRNA in faktorabhängigen frühen myeloiden (FDC-P1-) Zellen der Maus. Gleichwohl wirkt es synergistisch mit SCF bei der Wachstumsförderung dieser Zellen [4].

1.7.4. M-CSF ermöglicht das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung von Monozyten, Makrophagen und deren Vorläuferzellen

M-CSF (Makrophagen-koloniestimulierender Faktor; auch CSF-1) wird von vielen Zellen produziert, so auch von Fibroblasten und Makrophagen. Es ist wichtig für das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung von Monozyten, Makrophagen, Osteoklasten und deren Vorläuferzellen zu CD14⁺-Zellen. M-CSF fördert die Steigerung der Makrophagen-Scavenger-Rezeptor-Aktivität. Dieses Zytokin übt seine biologische Wirkung über die Bindung an den M-CSF-Rezeptor aus; einem Produkt des c-fms Proto-Onkogens [26, 120].

M-CSF ist der Wachstumsfaktor für Zellen der Monozyten/Makrophagen-Entwicklungslinie. Es hat aufgrund des ubiquitären Vorkommens von Makrophagen zahlreiche physiologische Funktionen. Während der Hämatopoese monozyten-/makrophagenstämmiger Zellen unterstützt es Proliferation, Überleben und Differenzierung. Des Weiteren induziert es die Zytokin- und Proteasensekretion durch Makrophagen zur Bekämpfung mikrobieller Infektionen.

Die M-CSF-Sekretion durch Osteoblasten regt die Osteoklastenreifung an, während die Sekretion durch uterus Epithel das Trophoblastenwachstum (Rezeptor) und somit die embryonale Entwicklung fördert. Auch Astrozyten sezernieren M-CSF, während der Re-

zeptor von Mikroglia und Neuronen in bestimmten ZNS-Anteilen exprimiert wird. Nicht zuletzt wurden eine abweichende Expressionen von M-CSF und SF-1R, die mit dem Krankheitsstadium und der Malignität zusammenhängen, bei Mammakarzinomen, Ovarial- und Endometrialtumoren gefunden [120].

1.7.5. Interleukin-4 wird von TH₂-Zellen produziert und induziert eine Reihe von Wachstums- und Reifungsvorgängen

Interleukin-4 (Interleukin 4) ist ein 15-19 kDa schweres dimeres Protein, welches von CD4⁺-Zellen, Mastzellen und basophilen Granulozyten produziert wird. Es induziert die Differenzierung von CD4⁺-Zellen zu TH₂-Zellen, während es die TH₁-Entwicklung supprimiert. Zudem wirkt es u.a. auf das Wachstum der B-Zellen.

Interleukin-4 inhibiert die Makrophagenaktivierung und führt zu deren Fusion, die *in vitro* multinukleäre Riesenzellen hervorbringt. Es induziert des Weiteren die Expression von MHC-II und des Mannoserezeptors und fördert die Endozytosefähigkeit der Makrophagen sowie eine alternative Form ihrer Aktivierung [50, 120].

Interleukin-4 beeinflusst mehrere Mechanismen der B-Zellen, einschließlich der Steigerung der MHC-II-Expression und des Ig-Klassen-Switching zu IgG₄ und IgE. Diese Effekte werden durch Interferon- γ herunterreguliert. Interferon- γ und Interleukin-4 wirken gegenseitig antagonistisch [120].

Wie die Zytokine GM-CSF und Interleukin-3 fördert auch Interleukin-4 die Differenzierung relativ unreifer dendritischer Zellen aus ihren Vorläufern. Unter dem Einfluß von GM-CSF und Interleukin-4 können sich aus adhärenenten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) wie auch aus monozytoiden CD14⁺-Zellen dendritische Zellen entwickeln, die *in vitro* mehrere Wochen in FCS- und zytokinhaltigem Medium überleben können. Die auf diese Weise entstandenen Zellen zeigen Eigenschaften unreifer dendritischer Zellen [4].

1.8. Die Oberflächenmarker CD1c, CD303, CD141 und CD304 werden von verschiedenen Subpopulationen dendritischer Zellen exprimiert

Die Oberflächenmarker CD1c, -141, 303 und 304 (zuvor BDCA-1, -3, -2, -4 (blood dendritic cell antigen)), deren Expression auf kultivierten mononukleären Zellen aus Nabelschnurblut (CBMC, cord blood mononuclear cells) in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, wurden von Dzionek et al. entdeckt und untersucht. Sie berichteten 2000 im Journal of Immunology über ihre diesbezüglichen Beobachtungen.

Für BDCA-1 wurde im Laufe weiterer Untersuchungen festgestellt, daß es sich um den Oberflächenmarker CD1c handelt. Die weiteren monoklonalen Antikörper, anti-BDCA-2 und -3, identifizieren zwei neue humane Antigene dendritischer Zellen und erhielten die Bezeichnung CD303 und CD141 (Cluster of Differentiation). BDCA-4 erwies sich als identisch mit-Neuropilin-1 und erhielt die Bezeichnung CD304.

1.8.1. CD1c wird von myeloiden dendritischen Zellen exprimiert

CD1c ist ein 43 kDa großes Oberflächenmolekül, welches neben dendritischen Zellen von kortikalen Thymozyten, Langerhanszellen, und einigen B-Lymphozyten getragen wird. Es dient der Antigenpräsentation.

Dzionek et al. beobachteten, daß CD1c nicht mit T-Zellen und Monozyten reagiert, jedoch mit einer großen Subpopulation kleiner ruhender CD19⁺-B-Zellen. Die Expression dieses Markers ist auf peripheren CD11c⁺⁺⁺CD123⁺-Zellen zu beobachten [31]; dendritischen Zellen myeloider Herkunft. Bei der Untersuchung von CD34⁺-Stammzellen und unreifen monozytengenerierten dendritischen Zellen (Mo-DC), die jedoch nur zu einem Zeitpunkt erfolgte, fanden sie sowohl eine CD1c- als auch CD1a-Expression.

1.8.2. CD141 wird myeloiden dendritischen Zellen zugeordnet

CD141 wird auch Thrombomodulin genannt. Es ist ein 100 kDa schweres C-Typ-Lectin. Dieses Oberflächenmolekül wird neben dendritischen Zellen auch von Monozyten, neutrophilen Granulozyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen getragen. Seine Funktion besteht in der Initiierung des Protein-C-Antikoagulationssignals.

Eine kleine Population von $CD11c^+CD123^-$ -Zellen exprimiert das laut Dzionek et al. myeloide dendritische Zellen markierende Antigen CD141. Diese Zellen unterscheiden sich von Lymphozyten und Monozyten und sind etwas größer als CD303-Zellen. Es fanden sich Subsets von $CD141^-CD11c^{+++}$ - und $CD141^+CD11c^+$ -Zellen.

Bei der in-vitro-Reifung von PBMC zeigte sich eine Steigerung der CD141-Expression auf plasmazytoiden $CD11^-CD123^{+++}$ - und myeloiden $CD1c^+CD11c^{+++}CD123^+$ -Zellen, mit einem Peak nach 24h. Die Expression von CD141 blieb bei der $CD141^+CD11c^{+++}$ -Population für mindestens 6h unverändert. Sie wurde innerhalb von 3h auf zumindest einigen Zellen der $CD141^-CD11c^{+++}$ -Subpopulationen induziert. Bei den $CD141^+$ -Zellen zeigte sich jedoch keine Coexpression von CD1c, CD2 und vielen Fc-Rezeptoren [31]. Dzionek et al. fanden keine CD141-Expression bei $CD34^+$ -Stammzellen und unreifen monozytengenerierten dendritischen Zellen.

1.8.3. Der Oberflächenmarker CD303 wird auf plasmazytoiden dendritischen Zellen gefunden

CD303 ist ein weiteres, 38 kDa schweres C-Typ-Lectin. In frischem Humanblut ist die Expression von CD303 (wie auch CD304) laut Dzionek et al. strikt an plasmazytoide $CD11c^-CD123^{+++}$ Zellen gebunden. Bei der in-vitro-Ausreifung von dendritischen Zellen aus Peripherblut (PBMC) zeigte sich innerhalb von 48h eine Verminderung der Expression auf plasmazytoiden $CD11c^-CD123^{+++}$ -Zellen. Die exprimierenden Zellen gehörten zu einer homogenen Zellpopulation (zwischen kleinen ruhenden Lymphozyten und Monozyten). $CD14^+$ -Zellen waren nicht vorhanden. CD303 reagierte nicht mit T-Zellen und Monozyten, aber einer großen Subpopulation kleiner ruhender $CD19^+$ -B-Zellen. Bei der Betrachtung von $CD34^+$ -Stammzellen und unreifen monozytengenerierten dendritischen Zellen fand sich keine Expression von CD303.

Interessanterweise zeigte sich, daß bei der Inkubation mit monoklonalen anti-CD303-Antikörpern die $CD303^+$ -Zellen bei 37 °C eine mAb-Internalisation (monoclonal antibody) mit einer der rezeptorvermittelten Endozytose ähnlichen Kinetik erfahren [31]. Ebenso interessant ist die Entdeckung, daß eine entsprechende Inkubation zu einer Suppression der für $CD303^+$ -Zellen typischen Interferon- α -Sekretion führt [33]. Auf diese Beobachtungen wird später noch detaillierter eingegangen.

1.8.4. CD304 (NP-1) ist ein Oberflächenmarker plasmazytoider dendritischer Zellen

In frischem Humanblut ist die CD304-Expression (wie bei CD303) als strikt beschränkt auf plasmazytoide $CD123^{+++}CD11c^{-}$ -, monozytenstämmige und $CD34^{+}$ -Zellen beschrieben. Bei der PBMC-DC-Reifung *in vitro* zeigt sich eine Steigerung der Expression auf $CD1c^{+}CD11c^{+++}CD123^{+}$ - und $CD11c^{+}/CD11c^{-}$ -Zellen. Hier ergab sich jedoch ein anderes Färbemuster als bei CD303. Auch fand keine Internalisation statt [31].

Dzionic, Iganaki et al. erkannten 2002, daß CD304 mit Neuropilin-1 (NP-1) identisch ist. NP-1 ist ein 130 kDa schwerer neuronaler Rezeptor der Klasse-3 Semaphorin-Subfamilie. Er fungiert als Rezeptor auf endothelialen und Tumorzellen für den vaskulären Wachstumsfaktor (VEGF-A). In Blut und Knochenmark wird NP-1 ausschließlich auf plasmazytoiden dendritischen, hingegen in den Tonsillen auch auf einigen anderen Zellen (besonders follikulären B-Helfer-Memory-T-Zellen) exprimiert [32].

1.9. Die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit

1.9.1. Die Ausgangssituation: Die neuen Marker waren bereits an PBMC-DC beobachtet worden

Dzionic et al. hatten im Jahr 2000 die Expression der neuen Oberflächenmarker BDCA-1 (CD1c), BDCA-2 (CD303), BDCA-3 (CD141) und BDCA-4 (CD304) an dendritischen Zellen, die aus peripherem Bluts gewonnen worden waren, ausführlich untersucht. In diesem Zusammenhang beschrieben sie eine Unterscheidungsmöglichkeit plasmazytoider und myeloider dendritischer Zellen mit Hilfe dieser neuen Marker (s.o.). CD34⁺-Stammzellen und unreife monozytengenerierten dendritischen Zellen waren nur zu einem Zeitpunkt und ohne weitere Kultivierung auf die Expression der neuen Marker hin untersucht worden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte nun das Vorhandensein der neuen Oberflächenmarker bei myeloiden dendritischen Zellen, die sich aus CD34⁺-Nabelschnurblut-Stammzellen entwickelten, nachgewiesen werden. Hierbei sollten mehrere aufeinanderfolgende Untersuchungen im Laufe der Zelldifferenzierung Aufschluß über den Zeitpunkt und das Ausmaß der Expression geben. Zusätzlich wurden Makrophagen kultiviert, um die Spezifität der Marker für dendritische Zellen auch bei einer Differenzierung aus gemeinsamen Stamm- und Vorläuferzellen beurteilen zu können.

1.9.2. Die Aufgabenstellung: Der Nachweis der Expression der Oberflächenmarker CD1c, CD141, CD303 und CD304 (NP-1) bei myeloiden dendritischen Zellen und Makrophagen aus CD34⁺-Nabelschnurblut-Stammzellen

Die von Dzionic et al. beschriebenen Oberflächenmarker sind bislang bezüglich Ihrer Expression nur auf PBMC-DC, d.h. dendritischen Zellen aus peripherem Humanblut umfassend untersucht worden. CD34⁺-Stammzellen und unreife monozytengenerierte dendritische Zellen sind jedoch nur zu einem Zeitpunkt untersucht worden. Es ist nicht weiter auf die Veränderungen im Laufe ihrer Differenzierung eingegangen worden.

Da für diese Marker für dendritische Zellen aus Peripherblut sowohl die Unterscheidungsmöglichkeit zwischen plasmazytoiden und myeloiden dendritischen Zellen als auch die Spezifität für dendritische Zellen an sich propagiert wurde, wurde in der vorliegenden Arbeit den folgenden Fragestellungen nachgegangen:

1. Ab wann oder in welcher Phase der Stammzellreifung werden die Oberflächenmarker CD1c, CD141, CD303 und CD304 auf myeloiden dendritischen Zellen aus CD133⁺-Stammzellen exprimiert?

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob und wann die neuen Oberflächenmarker von Vorläuferzellen und sich differenzierenden myeloiden dendritischen Zellen in Bezug auf ihr Entwicklungsstadium exprimiert werden. Da stammzellgenerierte dendritische Zellen bislang nicht zu mehreren Zeitpunkten während ihrer Differenzierung untersucht worden waren, sollten die von Dzionek et al. aufgestellten Aussagen bestätigt oder relativiert werden.

2. Lassen sich die neuen Oberflächenantigene auch auf den zum Vergleich aus denselben CD133⁺-Stammzellen angezüchteten Makrophagen finden?

Die vier Oberflächenmarker sollen laut Dzionek et al. spezifisch sein für dendritische Zellen. Aus den gleichen Stammzellkulturen angezüchteten Makrophagen dienten der Untersuchung dieser Aussage.

2. Material und Methodik

2.1. Die Versuche erfolgten an aus Nabelschnurblut isolierten CD133⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden aus Nabelschnurblut gewonnene CD133⁺-Zellen verwendet.

Das Nabelschnurblut stammte von Entbindungen in benachbarten Geburtskliniken, deren Hebammen das Blut bei Geburten gesund erscheinender und auf natürlichem Weg geborener Kinder entnahmen. Auch bei den Müttern durften keine Infektionen bekannt sein. Die Eltern haben der weiteren Verwendung des Nabelschnurblutes zugestimmt.

Für den Einschluß der Proben war eine ausreichende Menge von mindestens 20 ml (inkl. der 7 ml Transportmedium (CPD, Hepes, Pen/Strep, AmphoB)) notwendig. Das Blut durfte nicht älter als 24 Stunden und nicht koaguliert sein.

2.2. Die Sortierung der CD133⁺-Zellen aus dem Nabelschnurblut erfolgte in mehreren Schritten

2.2.1. Zuerst war die Gewinnung der mononukleären Zellen aus dem Gesamtblut erforderlich

Das Blut wurde von den Hebammen in vorbereitete sterile, 7 ml Transportmedium beinhaltende 50-ml-Röhrchen abgefüllt. Diese wurden bei Raumtemperatur gelagert und transportiert.

Die Proben wurden unter der Sterilbank verarbeitet. Es erfolgte eine Verdünnung mit sterilem HANKS Puffer (Hanks' Salt Solution w/o Ca²⁺, Mg²⁺, w/o Phenol Red). Jeweils ca. 7 ml dieser Lösung wurden in sterile 50-ml-Röhrchen pipettiert. Nach dem Auffüllen mit HANKS Puffer auf 35 ml wurden die Röhrchen verschlossen und zur Lösung eventuell noch vorhandener kleiner Koagel manuell geschüttelt.

Mit der automatischen Pipette wurde mit jeweils 15 ml Ficoll (Biocoll (Ficoll) Separating Solution; Isotonic Solution, Density 1,077) vorsichtig unterschichtet und 20 Minuten bei 660 x g ungebremst zentrifugiert. Die hierdurch gebildeten Interphasen, die die mononukleären Zellen des Nabelschnurblutes enthielten, wurden mit der Pipette abgenommen und in neue 50-ml-Röhrchen transferiert.

Zum Waschen der so gewonnenen Leukozyten wurden diese 10 Minuten bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellpellets mit auf Eis gekühltem HANKS Puffer resuspendiert. Die Zellen desselben Ursprungsröhrchens (also desselben Spenders) wurden wieder gemeinsam in ein 50-ml-Röhrchen gegeben und bei 200 x g für 15 Minuten zentrifugiert.

Nach der Verwerfung des Überstandes wurden zur Entfernung eventuell noch vorhandener größerer Fremdkörper (Nabelschnurreste, Koagel, etc.) die mit Kulturmedium (RPMI 1640, 10% FCS, 4% Zellkulturzusätze (Siehe Materialauflistung)) resuspendierten Zellen über ein 40-mm-Zellsieb in ein neues 50-ml-Röhrchen pipettiert. Das Endvolumen betrug je nach Pelletgröße 10-15 ml.

Nach gründlichem Mischen mit der Pipette wurden für die Zellzählung 10 µl entnommen und in ein Eppendorf-Pipettiergefäß zu 90 µl Turks-Lösung gegeben, während das 50-ml-Röhrchen bei 300 x g für 10 Minuten zentrifugiert wurde.

Die Zählung erfolgte in Neubauer-Zählkammern.

2.3. Die Sortierung der gesuchten CD133⁺Zellen wurde an der MiniMACS-Säule durchgeführt

Die Sortierung der für die Untersuchungen gewünschten Zellen erfolgte mittels Magnetobead-markierten CD133⁺-Antikörpern.

Das „Magnetic activated cell sorting“ (MACS) zeigte sich bei einem Vergleich fünf verschiedener Methoden der Nabelschnurblut-Stammzellsortierung als die verlässlichste Art der Zellisolation [113].

2.3.1. Die Grundlagen der MACS-Sortierung:

Die zu selektionierenden Zellen werden mit hochspezifischen Antikörpern, im vorliegenden Fall gegen den Oberflächenmarker CD133, markiert.

Die Suspension aus Zellen und markierten Antikörpern wird über eine sich in einem permanenten Magnetfeld befindende Separierungssäule gegeben. Dabei verblieben nur die magnetisch markierten Zellen an der Säule, die unmarkierten Zellen wurden durchgespült. Nach der Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld können die an ihr verbliebenen Zellen eluiert werden (positive Selektion).

Die Separierungseinheit besteht aus einem starken Dauermagneten an einem Ständer und einer Separierungssäule. Diese Säule enthält ein ferromagnetisches Gerüst mit räumlich sehr kleinen strukturellen Einheiten in einem sterilen Plastikgefäß.

Durch das Einbringen der Säule in das Magnetfeld des Dauermagneten resultieren sehr starke, räumlich kleine Magnetfelder. In unmittelbarer Nähe der so konstruierten Säule werden 10.000 Mal stärkere Felder erzeugt, als dies mit üblichen geometrischen Strukturen möglich gewesen wäre.

Beim Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld erfolgt eine schnelle Entmagnetisierung der Antikörper. Dies ermöglicht eine zügige Eluation der Zellen aus der Säule, ohne sie für die Anzüchtung der gewünschten Kulturen unbrauchbar zu machen.

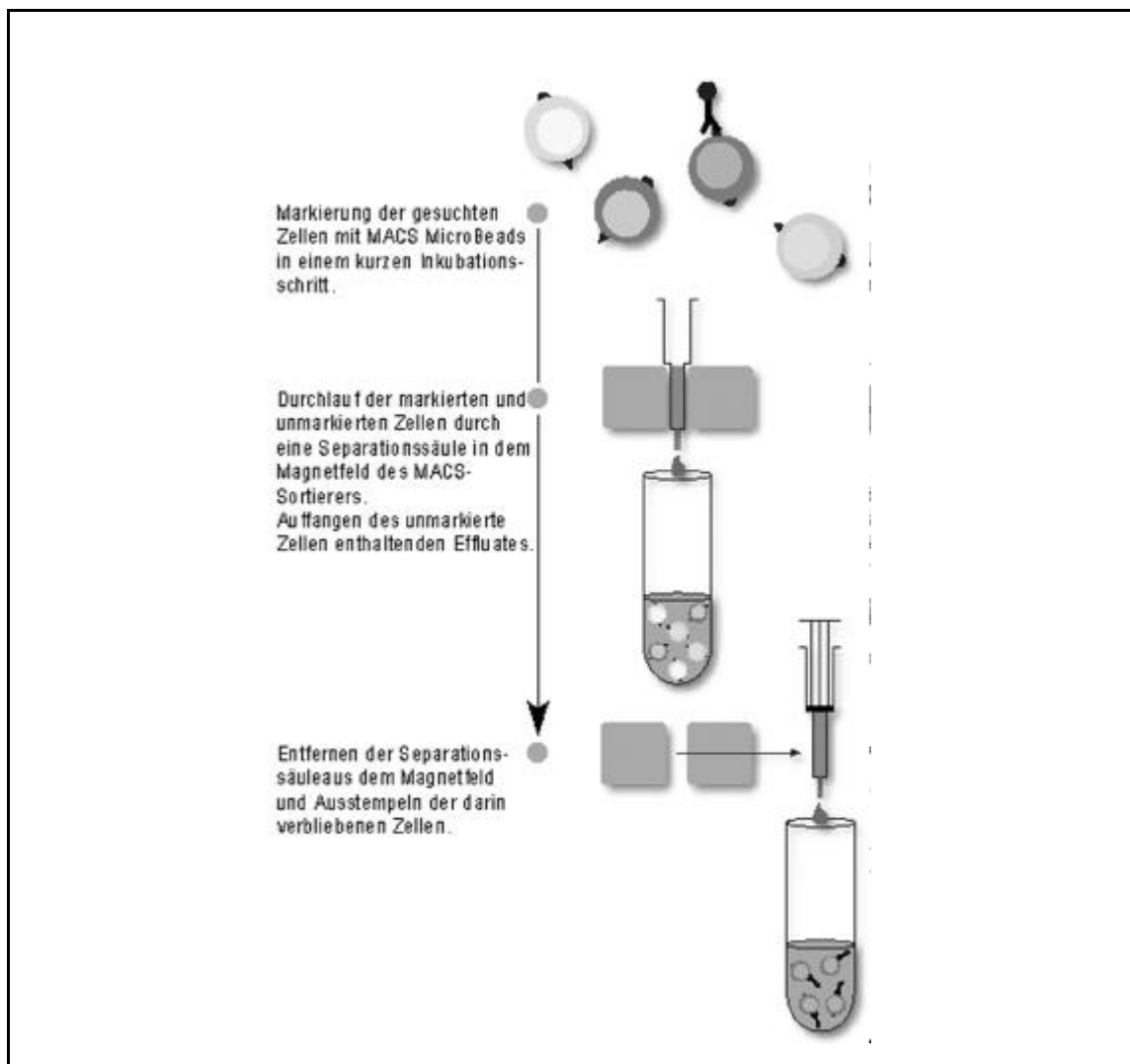


Abbildung 2: Die magnetassoziierte Zellsortierung mittels MACS:

Die Zellen werden mit MicroBeads markiert und über eine sich in einem starken Magnetfeld befindende Separierungssäule gegeben. Die nicht markierten Zellen durchlaufen die Säule, während die magnetisch markierten Zielzellen haften bleiben und nach dem Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld eluiert werden können.

2.3.2. Die Durchführung der MACS-Sortierung

Die Isolierung erfolgte nach Herstellerprotokoll.

Das Pellet der aus dem Nabelschnurblut gewonnenen mononukleären Zellen wurde bei einer Zellzahl von maximal 1×10^8 mit 250 μ l gekühltem HANKS Puffer oder HBSS resuspendiert und mit jeweils 100 μ l Fc-Rezeptor-Blockingreagenz und CD133⁺-Beads versetzt. Bei einer höheren Zellzahl wurde die Dosierung entsprechend angepasst.

Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit im Kühlschrank bei +7 °C wurde das 10-20fache des Labelingvolumens mit HANKS Puffer aufgefüllt und bei 300 x g 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen.

Die ebenfalls bei +7 °C vorgekühlte Säule wurde in das Magnetfeld gesetzt und mit 500 µl HANKS Puffer gespült, um eventuell vorhandene Beschichtungsreste zu entfernen. Die Zellen wurden je nach Pelletgröße mit 500-1000 µl HANKS Puffer resuspendiert und auf die Säule pipettiert, die darauf folgend noch zweimal mit HANKS Puffer zur Eluierung nicht gebundener Zellen gespült wurde. Der Durchlauf wurde in einem 15-ml-Röhrchen aufgefangen.

Nach der Entfernung aus dem Magnetfeld wurde die Säule auf ein weiteres 15-ml-Röhrchen gesetzt. Die angereicherten CD133⁺-Zellen wurden mit 1 ml HANKS Puffer mit Hilfe eines Kolbens aus der Säule in ein steriles Gefäß gepreßt. Nach der entsprechenden Vorbereitung einer zweiten Säule wurden die Zellen auf diese pipettiert und mit mindestens 2ml HANKS Puffer nachgespült.

Die so mit 98% Reinheit gewonnenen CD133⁺-Zellen wurden entsprechend mit 1 ml Kulturmedium von der Säule in ein steriles Röhrchen überführt. 10 µl davon wurden zur folgenden Zellzählung in der Fuchs-Rosenthal-Kammer in ein Eppendorf-Gefäß mit 90 µl Türks-Lösung überführt.

2.4. Die Kultivierung der gewonnenen Zellen erfolgte für die ersten sieben Tage für alle gewünschten Zellarten gleich

Die zur Kultivierung der CD133⁺-Zellen verwendeten Zytokine, die die Differenzierung dendritischer Zellen *in vitro* unterstützen, sind ausführlicher in der Einleitung der vorliegenden Arbeit beschrieben. Es handelt sich hier um GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor), IL-4 (Interleukin-4) und TNF- α (Tumornekrosefaktor alpha). Durch weitere Zugabe von SCF (Stammzellfaktor) zum Kulturmedium kann der Ertrag noch erhöht werden [23].

2.4.1. Die CD133⁺ Zellen wurden in Kulturmedium mit spezifischen Zytokinen beimpft

Die Kultivierung der gewonnen Zellen erfolgte in 24-Loch-Platten mit jeweils 1-ml-Wells. Dazu wurden die CD133⁺-Zellen je nach erreichter Zellzahl so mit Kulturmedium verdünnt, daß $1,5 \times 10^5$ Zellen pro ml Medium vorlagen.

Die Zellen wurden je Well mit 10 μ l SCF (Stammzellfaktor; 100 ng/ml), 10 μ l GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor; 100 ng/ml) und 25 μ l TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor alpha; 2,5 ng/ml; Stocklösung 1:100 verdünnt) stimuliert.

Die Inkubation dieser Platten fand bei 37 °C über sieben aufeinander folgende Tage statt. Bei täglichen mikroskopischen Kontrollen des Wachstums wurden die Kulturen am dritten Tag (und an den folgenden bis zum siebten bei Bedarf, d.h. bei großer Zellzahlzunahme) geteilt. Dabei wurde das Volumen je Well wieder auf 1 ml mit frischem Kulturmedium ergänzt.

2.4.2. Die Nachstimulation der Kulturen der drei zu vergleichenden Zellarten erfolgte mit unterschiedlichen Zytokinen

Die Nachstimulation der Kulturen zur Generation der drei Zellarten, die für die gewünschten Untersuchungen erforderlich waren, erfolgte am siebten Kulturtag. Mit Hilfe verschiedener Stimuli wurde die Differenzierung unreifer und reifer dendritischer Zellen sowie von Makrophagen induziert. So konnte die Expression der neuen Oberflächenmarker bei verschiedenen Zelltypen bzw. Reifungsstadien verglichen werden.

Die Zellen wurden zu diesem Zweck geerntet und in der Neubauerkammer gezählt. Nach Zentrifugation bei 300 x g für 10 Minuten wurde durch entsprechende Zugabe des Kulturmediums erneut eine Zellkonzentration von $5 \times 10^5/\text{ml}$ eingestellt, und á 1 ml in neue 24-Well-Platten pipettiert.

Zunächst wurden die Kulturen mit GM-CSF (10 $\mu\text{l/ml}$) und TNF- α (25 $\mu\text{l/ml}$) nachstimuliert, um das Wachstum unreifer myeloider dendritischer Zellen zu fördern.

Weiteren Kulturen wurde GM-CSF (10 $\mu\text{l/ml}$), TNF- α (25 $\mu\text{l/ml}$) und IL-4 (Interleukin 4; 5 $\mu\text{l/ml}$; d.h. 125 U/ml) zugegeben, was die Polarisation zu reifen myeloiden dendritischen Zellen zur Folge hatte.

Zum Vergleich mit den unreifen und reifenden dendritischen Zellen wurde wiederum weitere Kulturen ausschließlich mit M-CSF (Makrophagen-koloniestimulierender Faktor; 10 $\mu\text{l/ml}$; d.h. 25 U/ml) zur Induktion der Differenzierung reifer Makrophagen nachstimuliert.

Alle Kulturen wurden jeweils bis zum 14. Kulturtag beobachtet. Die Messung der Expression der neuen Oberflächenmarker CD1c, CD141, CD303 und CD304, jeweils in Bezug auf die Expression von CD1a, CD14 und CLA, erfolgte täglich vom achten bis 14. Kulturtag.

2.5. Die FACS-Analyse dient der Erkennung der Oberflächenmarker-Expression bei den unterschiedlich kultivierten Zellen

2.5.1. Grundlagen

Das Prinzip der Durchflußzytometrie ist die simultane Messung verschiedener physikalischer und chemischer Eigenschaften der Zellen oder Partikel, die hintereinander in einem Flüssigkeitsstrom angeordnet untersucht werden. Die Analyse der Zellen erfolgt dabei über die gleichzeitige Bestimmung ihrer Fluoreszenzintensität und ihres Streulichtes.

2.5.1.1. Die Anfärbung der Oberflächenantigene zur Bestimmung ihrer Expression in Bezug auf die interessierenden Zelltypen

Die Identifikation der angezüchteten Zellen erfolgte anhand der Fluoreszenz, deren Stärke die Expressionsdichte der markierten Oberflächenantigene widerspiegelt. Zu diesem Zweck wurden die kultivierten Zellen mit Hilfe monoklonaler, gegen Leukozytenoberflächen-Antigene gerichtete Antikörper markiert. Die Antikörper waren direkt an jeweils einen der Fluoreszenzfarbstoffe FITC (Fluoresceinisothiocyanat; 530 nm), PE (Phycoerythrin; 585 nm) und Tricolor (kombinierter r-Phycoerythrin-Cyanin-(Cy5)-Farbstoff; >650 nm) gekoppelt.

2.5.1.2. Der Aufbau eines Durchflußzytometers

Zur Analyse wurde die in einem Reagenzröhrchen enthaltene Suspension mit einer Zellkonzentration von ca. 20.000 Zellen/ml über eine Stahlkapillare mittels Überdruck in die aus Quarzglas bestehende Meßküvette eingeführt. Die Zellen passierten in einem Hüllstrom den Analysepunkt. Der Hüllstrom dient der Stabilisierung und Verengung des Probestroms im Zentrum der Meßküvette, so daß die Zellen einzeln und hintereinander zum Analysepunkt gelangen (Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung).

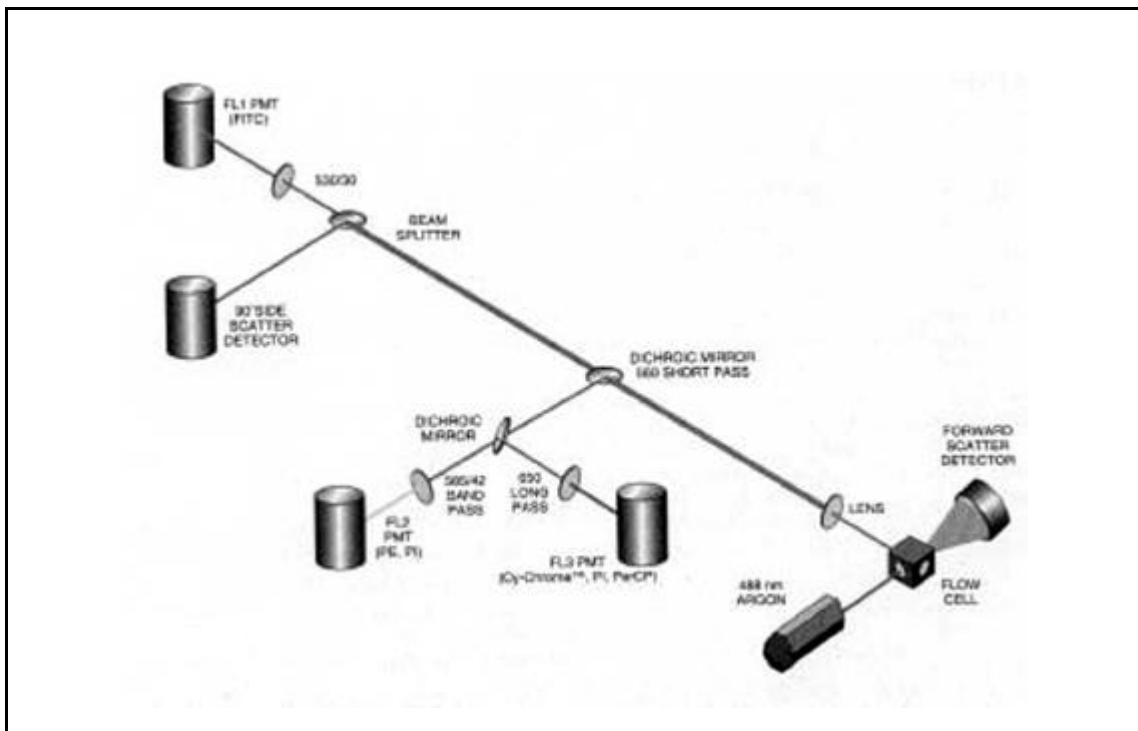


Abbildung 3: Der Schematische Aufbau eines Durchflußzytometers:

Die Suspension der zuvor mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Zellen wird hintereinander in eine Quarzglas-Meßküvette eingesogen. An einem definierten Analysepunkt werden die Signale eines Vorwärts- und eines Seitwärtsstreulichts erfaßt, die so gewonnenen Daten verrechnet und als Histogramme und Dotplots dargestellt.

2.5.1.3. Die Messung der Lichtstreuung und der Fluoreszenz

Die Lichtstreuung wird definiert als physikalischer Prozeß, bei dem die Zelle den einfallenden Lichtstrahl reflektiert. Hierbei wird nur die Richtung, nicht aber die Wellenlänge des Lichtes verändert. Zur Ausprägung des spezifischen Lichtstreuungswinkels tragen die Zellgröße und -membran, der Zellkern und intrazelluläre granuläre Bestandteile bei.

Das Licht wird nicht in alle Richtungen gleichzeitig gestreut. Der größte Anteil fällt in Vorwärtsrichtung (entlang des einfallenden Lichtstrahls) und bildet hauptsächlich das Maß für die Zellgröße (Vorwärtsstreulicht). Das im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreute Licht hängt wesentlich mehr von der Zelldichte und der Granularität, jedoch nur zu einem geringen Teil von der Zellgröße ab (Rechtwinkelstreulicht).

Mittels eines 15 MW Argonlasers werden die Fluoreszenzfarbstoffe durch Licht der Wellenlänge 488 nm zur Emission von Lichtquanten definierter Wellenlänge angeregt. Zur Darstellung der gesuchten Eigenschaften werden die oben genannten Farbstoffe mit ihrem unterschiedlichem Absorptionsspektrum verwendet.

2.5.1.4. Die Signalverarbeitung und Datenauswertung

Die Zellen passieren aufgrund des geringen Kapillardurchmessers einzeln den Analysepunkt, an dem die Signale des Vorwärts- und Rechtwinkelstreulichtes gemessen wurden. Die Kombination von Signalmessung und -verstärkung ergibt ein analoges Signal, das in ein computerverwertbares Digitalsignal umgewandelt wird. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software „CellQuest™“ (BD Biosciences) sowohl als Histogramme als auch als korrelierte Zweiparameterdarstellung (Dot Plot) ausgewertet.

2.5.1.5. Die Autofluoreszenz und Qualitätskontrolle

Die Zellsuspensionen zeigten bei der Anregung mit 488 nm auch ohne Anfärbung eine gewisse Eigenfluoreszenz. Bei diesem Signal handelte es sich um das Autofluoreszenzlicht, welches auch ungefärbte Zellen aufgrund ihrer eigenen chemischen Zusammensetzung emittieren. Bei der Auswertung der gemessenen Fluoreszenzwerte wurde die zuvor mittels einer Leerprobe bestimmte Eigenfluoreszenz berücksichtigt.

2.5.2. Die Durchführung der durchflußzytometrischen Messungen an den zu vergleichenden drei Zellarten

Zur Untersuchung der Expression der Oberflächenmarker CD1c, CD141, CD303 und CD304 wurden täglich an den Kulturtagen 8-14 je Kultur $1-2 \times 10^5$ Zellen entnommen und zur Charakterisierung ihres Reifungsgrades und Entwicklungsrichtung mit Oberflächenmolekülen markiert. Dann wurde die Expression mittels Durchflußzytometrie gemessen.

Die geernteten Zellen wurden in dem ersten der elf benötigten FACS-Röhrchen bei 300 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstands wurde das Zellpellet mit 1100 µl HBSS mit Natriumacid (Hanks' Balanced Salt Solution) resuspendiert, und jeweils 100 µl in die FACS-Röhrchen 2-11 pipettiert. Die BDCA-Antikörperlösungen waren vorbereitet und auf 10% verdünnt worden (180 ml HBSS und 20 ml Ak-Lösung).

Nach dem folgenden Schema wurden die Zellen mit fluoreszierend markierten Antikörpern gemeinsam inkubiert:

Leerprobe		in FACS-Röhrchen #1
CD1a-FITC	15 ml	in FACS-Röhrchen # 2-6
CD14-Tricolor	3,5 ml	in FACS-Röhrchen # 2-6
CLA15-FITC	15 ml	in FACS-Röhrchen # 7-11
BDCA-1-PE	10 ml	in FACS-Röhrchen # 2+7
BDCA-2-PE	10 ml	in FACS-Röhrchen # 3+8
BDCA-3-PE	10 ml	in FACS-Röhrchen # 4+9
BDCA-4-PE	10 ml	in FACS-Röhrchen # 5+10
Kontroll-Ak-PE	5 ml	in FACS-Röhrchen # 6+11

Die auf diese Weise präparierten Zellen wurden für 15 Minuten im Kühlschrank bei +7 °C inkubiert. Daraufhin wurde jedem Röhrchen 1 ml HBSS zugegeben. Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 1000 x g wurde der Überstand verworfen und die Pellets in jeweils 250 µl HBSS+Acid aufgenommen.

Die Proben wurden dunkel gelagert und die Messung unverzüglich durchgeführt.

Die verwendeten Materialien:

AC133⁺-MicroBeads

AC133⁺ Cell Isolation Kit: 2x2 ml, in 0,1% Gelatin, 0,05% Na-azide
Order 130-050-801, Lot No. 501 012 3037, Miltenyi Biotec

BDCA 1-4 - PE

Blood Dendritic Cell Antibody
Miltenyi-Biotec, Cat No.?

Brutschrank:

(CO₂-Inkubator; Heraeus, Düsseldorf)
Bedingungen: 37 °C, 8,5% CO₂

CD1a-FITC:

Cat.No. 555806, Lot No. M057670, PharMingen

CD14 - Tricolor:

Code No. MH CD1406, Lot No. 14010103, Spec.No. LMHCD1406, Caltag Laboratories, Burlingame, CA

CLA-FITC:

Cat.No. 35824X, UPN 555947, Lot No. M048937, PharMingen

FACScan:

Durchflußzytometer, Becton Dickinson (BD GmbH), Heidelberg

Fc-Blockingreagenz

AC133⁺ Cell Isolation Kit: 2x2 ml,
in 0,1% gelatin, 0,05% Na-azide
Order 130-050-801, Lot No. 501 012 3037, Miltenyi Biotec

Ficoll:

Biocoll (Ficoll) Separating Solution;
Isotonic Solution, Density 1,077
Cat.No. L 6115, Lot No. 008B, Biochrom KG

GM-CSF:

Leucomax, Novartis Pharma GmbH, Nürnberg

HANKS:

Hanks' Salt Solution
w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} , w/o Phenol Red
Cat.No. L 2045, Lot No. 400B, Biochrom KG, Leonorenstr. 2-6, 12247 Berlin

HBSS-Acid:

HBSS Hanks' Balanced Salt Solution, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
mit 1% Natriumacid

IL-4 (Interleukin-4):

rekombinant, Human, Tebu/Peptrotech, FfM; Art.No: 016-300-25-B

Kontroll-Ak-PE:

Mouse IgG₁ PE, Ch.B. 19112, Becton Dickinson

Kulturmedium:

siehe „Medium“

Kulturplatten:

Multiwell, 24 2ml-Vertiefungen, Flachboden, mit Deckel

MACS-Trennung:

MACS-Multistand: Miltenyi-Biotec, mit Mini-MACS-Magnet
Säulen: Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach; MACS separating columns
Order No. 130-042-201; Lot No. 500 122 00 15
Fc-Blockingreagenz und AC133⁺-Ak-Beads AC133⁺ Cell Isolation Kit: 2x2 ml, in
0,1% gelatin, 0,05% Na-azide
Order 130-050-801, Lot No. 501 012 3037, Miltenyi Biotec

M-CSF:

Tebu/Peptrotech, FfM

Medium:

RPMI 1640 VLE RPMI 1640 Medium,
Endotoxin: $\leq 0,01$ EU/ml,
w 2,0g/l NaHCO_3 , w/o L-Glutamine
Cat.No. F 1415, Lot No. 249 B, Biochrom KG
+ 10% FCS Fetales Kälberserum, Biochrom KG
+ 4% Zellkulturzusätze (s.o.)

Mikroskope:

Kulturkontrolle: Olympus CK2
Zählung: Zeiss

Nabelschnurblut bzw. CBMC (Auswahlkriterien):

Geburten gesund erscheinender, auf natürlichem Wege (termingerecht)
geborener Kinder (keine Sectiones); keine Mütter mit bekanntem HIV/HCV;
Mind. 20 ml (incl. Transportmedium), Blut max 24 h alt, keine makroskopisch
sichtbaren Koagulationen

PC-Software:

CellQuest 3.3 (BD Biosciences Heidelberg)
CalisPro (FileMaker), Graph Pad Prism ^(TM)

Pipetten (Automatische Pipette 14ml; Handpipetten 100ml, 20ml, 10ml, 1ml):

Eppendorf-Pipetten Heilbronn

Röhrchen (50ml, 15ml, FACS-Röhrchen, Eppendorf-Gefäße):

15 ml konische Röhrchen (Blue Max Jr.) Falcon/BD, Heidelberg
FACS-Röhrchen Falcon/BD, Heidelberg

SCF:

Stammzell-Faktor; Tebu, Cat. 300-07

TNF-a:

R&D Systems, Wiesbaden; Cat. 210-TA

Transportmedium:

50ml CPD (Citrate-Phosphate-Dextrose-Solution); Sigma C7165
+ 1 ml Hepes Puffer, Biochrom KG
+ 1 ml Pen/Streps.u.
+ 1 ml Amphotericin B Biochrom KG
(je 7 ml pro 50-ml-Röhrchen)

Türk'sche Lösung:

Fluka Chemie, Buchs, CH

Zählkammern:

Neubauer, Fuchs-Rosenthal BD, Heidelberg

Zellkultur-Zusätze:

Zu gleichen Teilen (alles Biochrom KG)

Pen/Strep 10.000 U/ 10.000mg/ml, Cat.No. A 2213, Lot No. 059 B

L-Glutamin Cat.No. K 0282, Lot No. 380 B

Non-essential Aminoacids Cat.No. K 0293, Lot No. 168 A

Sodium Pyruvate Cat.No. L 0473, Lot No. 157 A

Zentrifugen:

Omnifuge 2.0RS (Sepatech), Heraeus, Düsseldorf

Heraeus 4500, Heraeus, Düsseldorf

3. Ergebnisse

3.1. Beobachtungen während der Kultivierung der CD133⁺-Zellen aus Nabelschnurblut

Zur Gewinnung der benötigten Zellen mit Hilfe der Mini-MACS-Säule wurden die CD133⁺-Zellen mit magnetassoziierten Micro-Beads markiert und über eine sich in einem starken Magnetfeld befindende Säule gegeben. Die Reinheit der so gewonnenen Zellen wurde durchflußzytometrisch kontrolliert, wobei erwartungsgemäß 98,4% der gewonnenen Zellen den gewünschten Oberflächenmarker trugen und somit den erforderlichen CD133⁺-Zielzellen für diese Arbeit entsprachen. Die verwendeten Zellen stammten für die einzelnen Kulturen der drei betrachteten Zellarten von jeweils nur einem Probanden.

3.1.1. Für die Gewinnung von Vorläufern myeloider dendritischer Zellen wurden die CD133⁺-hämatopoetischen Stammzellen mit SCF, TNF- α und GM-CSF nachstimuliert

Zur Anzucht der ersten der drei zu vergleichenden Zelltypen, den unreifen myeloiden dendritischen Zellen, wurden die kultivierten CD133⁺-Zellen am siebten Kulturtag mit TNF- α und GM-CSF nachstimuliert. Dies induzierte eine weitere Vermehrung der Zellzahl myeloider Vorläufer dendritischer Zellen.

Die in diesen Kulturen entstandenen Zellen zeigten bezüglich der verwendeten Oberflächenmarker für die FACS-Analyse die folgende Verteilung an Oberflächenmarkern:

Die Expression von CD1a (charakteristisch für reife dendritische Zellen) in Bezug auf die Gesamtpopulation fiel im Verlauf der Beobachtungen von Tag 8 bis Tag 14 drastisch ab. CD14⁺ wurde hingegen im Verlauf zunehmend, an Tag 14 von der Hälfte der Zellen exprimiert. Auch die erwartete Coexpression der beiden Marker CD1a und CD14 (kennzeichnend für unreife dendritische Zellen, welche die erwünschte Zielpopulation dieser Kulturen darstellte), zeigte sich zunehmend auf bis zu einem Drittel der Zellen an Tag 14. Die CD1a⁻CD14⁻-Zellen nahmen im Verlauf von einem Drittel der Gesamtpopulation ausgehend deutlich ab.

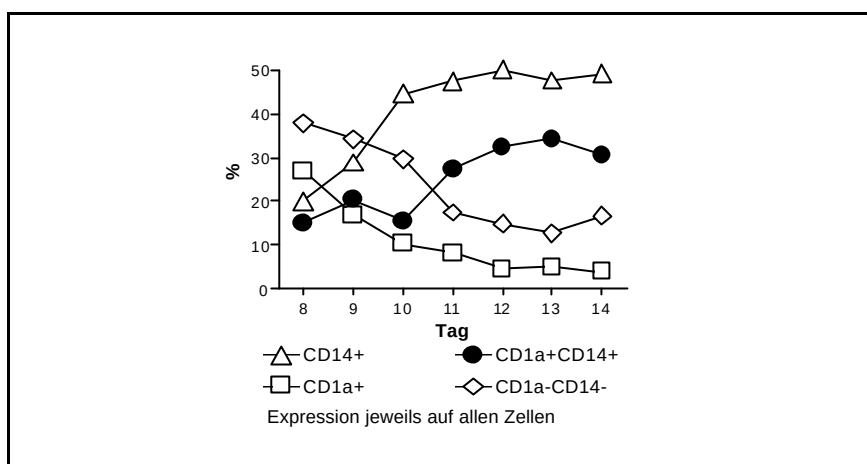


Abbildung 4: Subpopulationen der unreifen dendritischen Zellen:

Zur Datenerhebung wurden jeweils sechs durchflußzytometrische Untersuchungen pro Zellart und Tag durchgeführt. Hier und in den folgenden Graphen sind jeweils repräsentative Ergebnisse eines der Experimente gezeigt. Im Verlauf der Messungen von Tag 8 bis Tag 14 nimmt die CD14-Expression (monozytoide Zellen) und die CD1a-CD14-Coexpression als Ausdruck der frühen Polarisationsphase in der Entwicklung zu dendritischen Zellen stetig zu.

3.1.2. Zur Differenzierung reifer dendritischer Zellen wurde den Kulturen IL-4, TNF- α und GM-CSF zugesetzt

Um reife myeloide dendritische Zellen anzuzüchten, wurden die Zellen mit IL-4 (Interleukin-4), TNF- α (Tumornekrosefaktor alpha) und GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor) nachstimuliert. Dies war zur Beobachtung eventueller Expressionsunterschiede in Abhängigkeit von Reifestadien, im Gegensatz zu den unreifen dendritischen Zellen erforderlich.

Für die Kulturen dieser reifen myeloiden dendritischen Zellen und der zum Vergleich angezüchteten Makrophagen wurden die gewonnenen CD133⁺-Zellen der Probanden jeweils nach den ersten sieben Tagen geteilt und spezifisch nachstimuliert. Die reifen dendritischen Zellen nahmen an Größe zu, vermehrten sich aber nicht in demselben Ausmaß wie in den ersten sieben Kulturtagen und wie die Makrophagen. Aufgrund dieser Beobachtung wurden 2/3 der Zellen zur Polarisation reifer dendritischer Zellen nachstimuliert und nur 1/3 zur Anzucht von Makrophagen, um so jeweils eine ausreichende Zellmenge für die Durchflußzytometrie zu gewährleisten.

Die reifen myeloiden dendritischen Zellen exprimierten bezüglich der verwendeten Oberflächenmarker für die FACS-Analyse die folgenden Oberflächenmarker:

Die CD1a-Expression, welche die Polarisation reifer dendritischer Zellen darstellt, zeigte sich im Verlauf von Tag 8 bis Tag 14 bis auf 40% der Gesamtpopulation ansteigend. CD14 wurde währenddessen abnehmend, an Tag 14 nur noch von 10% der Zellen getragen.

Die $CD1a^+CD14^+$ -Coexpression (unreife dendritische Zellen, Vorläuferzellen) zeigte sich im Verlauf deutlich abnehmend, und auch die $CD1a^-CD14^-$ -Zellen schwanden im Beobachtungszeitraum.

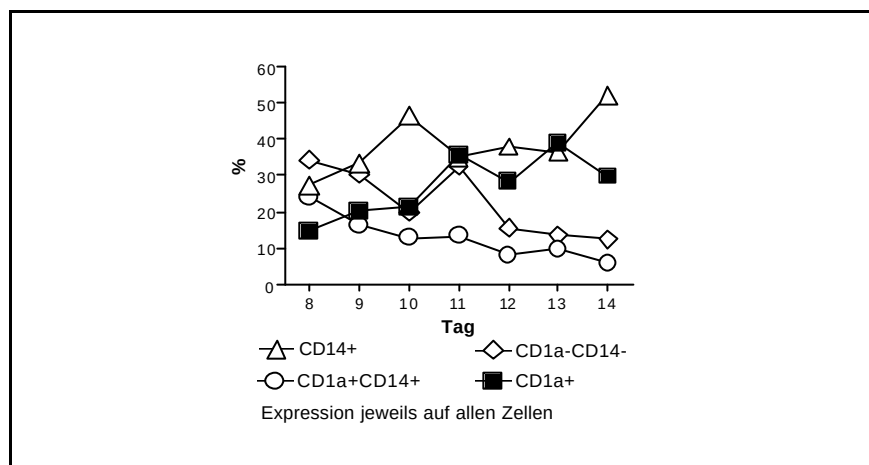


Abbildung 5: Subpopulationen der reifen dendritischen Zellen:

Um die in den ersten sieben Kulturtagen gewonnenen unreifen myeloiden dendritischen Zellen zur weiteren Reifung anzuregen, wurde IL-4 zugesetzt. Im Verlauf der Messungen zeigte sich daraufhin eine Zunahme der $CD14^+$ (monozytoiden)- und $CD1a^+$ -Zellen. Letzteres ist Ausdruck der zunehmenden Polarisation zu reifen dendritischen Zellen (Repräsentative Darstellung einer der sechs Verlaufskurven).

3.1.3. Zur Überprüfung der spezifischen Marker für dendritische Zellen wurden weitere Kulturen mit M-CSF zur Anzucht von Makrophagen versetzt

Zur Untersuchung der Spezifität der neuen Marker für dendritische Zellen wurde ein Drittel der kultivierten CD133⁺-Stammzellen am siebten Kulturtag ausschließlich mit M-CSF (Makrophagen-koloniestimulierender Faktor) nachstimuliert. Daraufhin war die Differenzierung zu Makrophagen zu beobachten. In diesen Kulturen zeigte sich auch weiterhin eine rege Zellvermehrung. Somit war eine ausreichende Ausbeute an Zellen für die Durchflußzytometrie für die reifen dendritische Zellen und die Makrophagen gewährleistet.

Die in diesen Kulturen angezüchteten Zellen exprimierten bezüglich der verwendeten Oberflächenmarker für die FACS-Analyse besonders die folgenden Oberflächenmarker: CD1a⁺-Zellen waren kaum vorhanden und zeigten sich nur von Tag 8 bis Tag 11. Die Expression des CD14-Markers stieg im Verlauf bis auf 85%, was die Differenzierung der erwünschten Zellen bestätigte. Gleichzeitig fiel erwartungsgemäß die Coexpression der beiden Oberflächenmoleküle CD1a⁺CD14⁺ drastisch ab, ebenso ausgeprägt schwanden die CD1a⁻CD14⁻-Zellen.

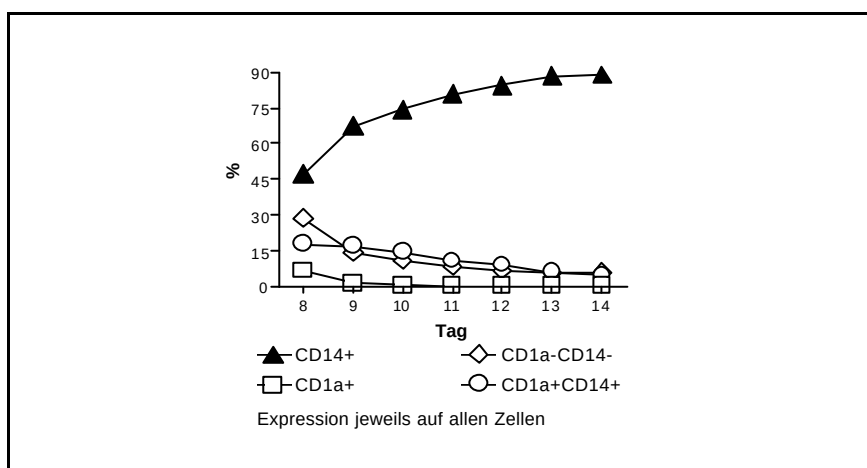


Abbildung 6: Subpopulationen der Makrophagenkulturen:

Bei den zum Vergleich mit M-CSF nachstimulierten Kulturen zeigte sich erwartungsgemäß von d 8-14 eine Abnahme der CD1a⁺CD14⁺-Expression. Ein Anstieg ist nur bei den CD14⁺-Zellen (monozytoide) zu beobachten. Diese Zellen wurden zur Untersuchung der Aussage angesetzt, daß die Marker spezifisch für dendritische Zellen seien. (Repräsentative Darstellung, aus den Verlaufskurven von sechs Untersuchungen ausgewählt).

3.2. Die Expression von CD1c, CD141, CD303 und CD304 auf stammzellgenerierten dendritischen Zellen

3.2.1. Der auf myeloiden dendritischen Zellen zu erwartende Oberflächenmarker CD1c

Die Expression von CD1c, welches in der Literatur als spezifisch für myeloide dendritische Zellen beschrieben war, stieg in keiner der Kulturen über 45% und war vor allem bei den unreifen dendritischen Zellen zu beobachten. Insgesamt wurde CD1c jedoch nur von etwa 15% der CD1a⁺CD14⁺ dendritischen Zellen exprimiert. Es zeigte sich eine deutliche Zunahme der Bindungsstellen auf reifen CD1a⁺ dendritischen Zellen (max. Tag 13), deren Subpopulationen in den Kulturen der unreifen dendritischen Zellen jedoch deutlich abnahm. Die Bindungsstellen nahmen im Verlauf der Beobachtungen auf den unreifen CD1a⁺CD14⁺ dendritischen Zellen zu (max. Tag 13/14), deren Zahl erwartungsgemäß auch in Bezug auf die Gesamtpopulation zunahm.

Bei den reifen dendritischen Zellen wurde CD1c zunehmend von bis zu einem Viertel der Zellen (max d 11) exprimiert. Auffallend war die hier besonders die Zunahme der Bindungsstellen auf CD1a⁺ dendritischen Zellen (bis 70% der Subpopulationen, max Tag 11). Dies bewies die Differenzierung reifer myeloider dendritischer Zellen.

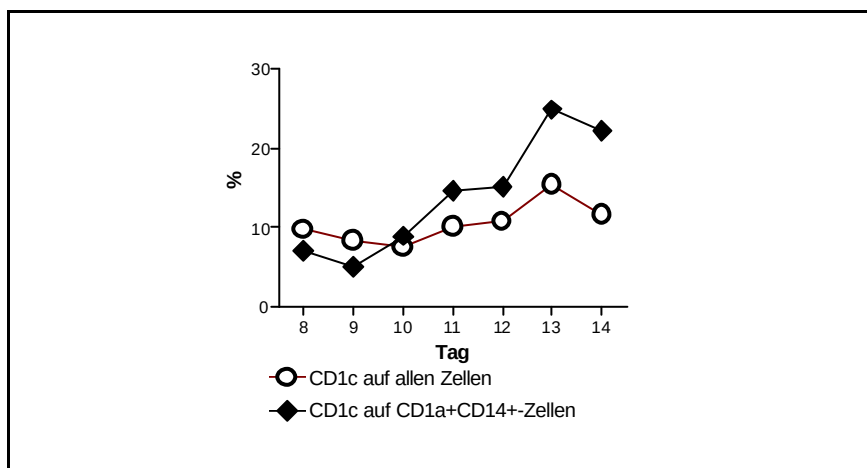


Abbildung 7: Verlauf der CD1c-Expression auf den unreifen dendritischen Zellen:

Im Verlauf der Messungen vom achten bis vierzehnten Kulturtag zeigte sich bei den unreifen dendritischen Zellen (Nachstimulation mit mit TNF- α , SCF und GM-CSF), daß die CD1c-Expression in Bezug auf die Gesamtpopulation nicht über 15% stieg. Der Marker wurde hier von bis zu 25% der CD1a⁺CD14⁺-Zellpopulation (frühe Polarisationsphase) exprimiert. (Repräsentative Darstellung, aus sechs Untersuchungen ausgewählt).

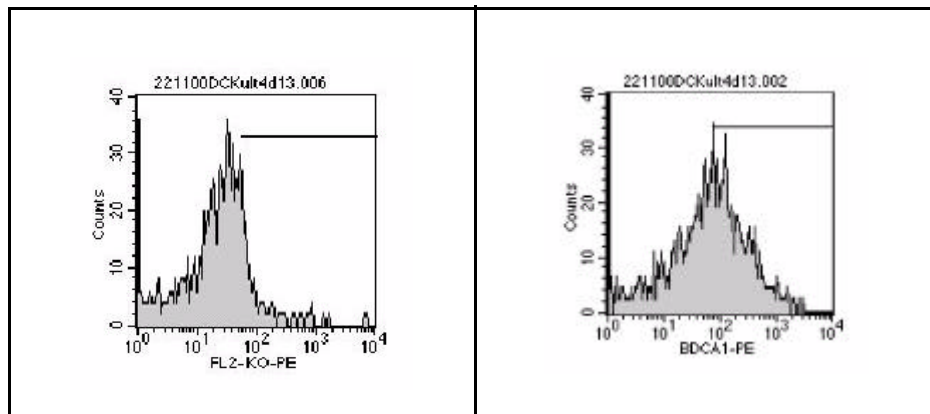


Abbildung 8: CD1c-Expression auf CD1a⁺CD14⁺ dendritischen Zellen:

Von Tag 8 bis Tag 14 wurden täglich Zellen geerntet, mit farbstoffgebundenen spezifischen Antikörpern markiert und so die Expression der interessierenden Oberflächenmoleküle mittels Durchflußzytometrie sichtbar gemacht. Die unreifen dendritischen Zellen exprimierten CD1c im Verlauf der Beobachtungen ansteigend bis zu ca. 30%.

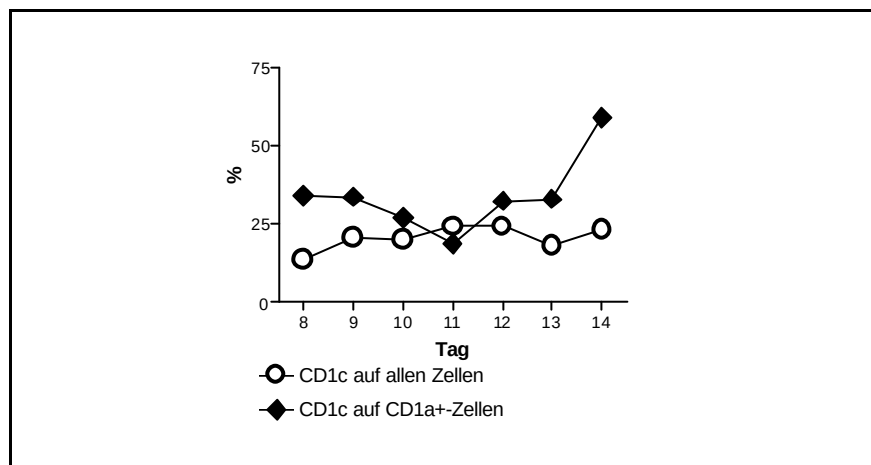


Abbildung 9: CD1c-Expression auf reifen dendritischen Zellen:

Um die unreifen myeloiden dendritischen Zellen der angelegten Kulturen zu weiterer Differenzierung anzuregen, wurden Kulturen mit IL-4, TNF- α und GM-CSF nachstimuliert. Im Verlauf der täglichen durchflußzytometrischen Messungen zeigte sich bei diesen Kulturen eine leichte Vermehrung der CD1a⁺-Zellen, die zunehmend CD1c exprimierten, während die Expression in Bezug auf die Gesamtpopulation dieser Kultur fast unverändert blieb.

Bei den Makrophagen wurde praktisch keinerlei Expression des CD1c-Antigens beobachtet, da sich wie zu erwarten war nur äußerst wenige Zellen mit diesen Oberflächeneigenschaften entwickelten.

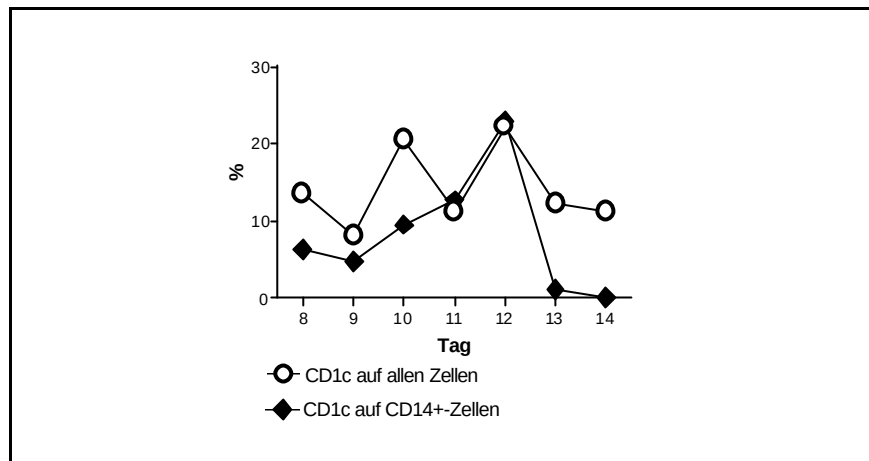


Abbildung 10: CD1c-Expression auf Makrophagen:

Um die Spezifität der Marker für dendritische Zellen zu beweisen, wurden aus den CD133⁺-Stammzellen in weiteren Kulturen mittels Nachstimulation mit M-CSF Makrophagen generiert. Diese zeigten eine proportional zum CD14⁺-Abfall verlaufend sinkende Expression des Oberflächenmarkers CD1c, der auch in Bezug auf die Gesamtpopulation dieser Kultur nicht über 22% stieg (Repräsentative Darstellung, aus sechs Untersuchungen ausgewählt).

3.2.2. Eine CD141-Expression war nur bei wenigen Zellen zu beobachten

Dieser Antikörper, der in der Literatur als spezifisch für myeloide dendritische Zellen beschrieben wird, wurde sowohl von den unreifen wie den reifen dendritischen Zellen von weniger als 10% der Zellen exprimiert. Besonders deutlich zeigte er sich hier auf CD14⁺ dendritischen Zellen, während die meisten anderen Subpopulationen ihn nicht oder nur zu einem geringen Anteil trugen. Die Expressionsrate auf CD14⁺-Zellen stieg z.B. bei den unreifen dendritischen Zellen deutlich an, wobei diese Subpopulation im Verlauf zunehmend bis zur Hälfte der Gesamtzellzahl ausmachte.

Bei den Kulturen der reifen myeloiden dendritischen Zellen sank die Expression auf den CD14⁺ Zellen drastisch ab. Der Anteil dieser Zellen an der Gesamtzellzahl sank im Verlauf bis Tag 14 deutlich ab.

Bei den Kulturen der Makrophagen nahm der Anteil der CD141-Expression in Bezug auf die Gesamtpopulation ebenfalls kontinuierlich ab. Im Verlauf sank sie bei deren CD14⁺- und CD1a⁺CD14⁺- Zellen auf bis zu unter 5%.

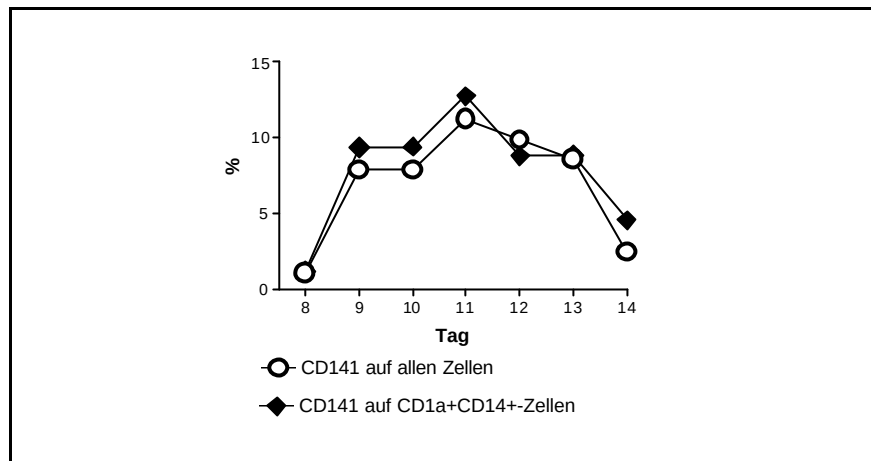


Abbildung 11: CD141-Expression auf unreifen dendritischen Zellen:

Die CD141-Expression der Gesamtpopulation der unreifen dendritischen Zellen verlief bei der durchflußzytometrischen Untersuchung parallel des gering ansteigenden und dann wieder abfallenden Verlaufes der Expression dieses Markers (repräsentative Darstellung aus sechs Untersuchungen.)

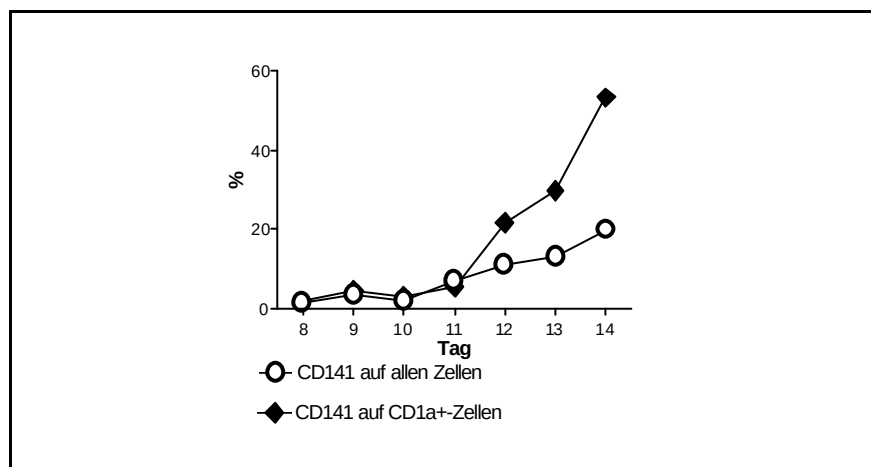


Abbildung 12: CD141-Expression auf reifen dendritischen Zellen:

Die durchflußzytometrische Untersuchung der Zellen erforderte die Anfärbung der interessierenden Oberflächenmoleküle mit spezifischen markierten Antikörpern. Bei den reifen dendritischen Zellen stieg die CD141-Expression der Gesamtpopulation langsam an und war mit der Zunahme der CD141-exprimierenden polarisierten CD1a⁺-Zellen assoziiert (repräsentative Darstellung, aus sechs Untersuchungen).

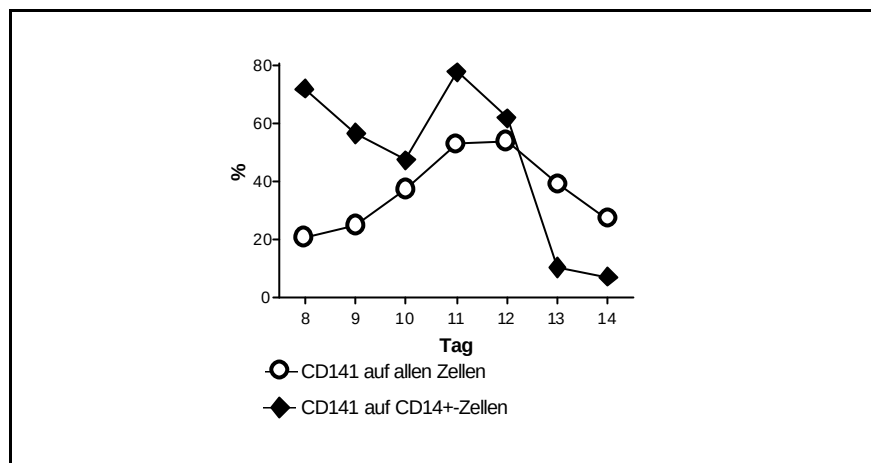


Abbildung 13: CD141-Expression auf Makrophagen:

Um die Spezifität der vier untersuchten Marker für dendritische Zellen zu belegen, wurden aus den gleichen CD133⁺-Stammzellen mittels M-CSF Makrophagen angezüchtet und entsprechend den unreifen und reifen dendritischen Zellen mit markierten Antikörpern inkubiert und durchflußzytometrisch untersucht. Im Verlauf der Messungen an den Makrophagen (CD14⁺) nahm die CD141-Expression drastisch von 80% auf unter 10% ab, während sie in Bezug auf die Gesamtpopulation dieser Kultur einen gemäßigeren Verlauf zeigte (repräsentative Darstellung, aus sechs Experimenten ausgewählt).

3.2.3. Der Oberflächenmarker CD303

Dieses Antigen sollte plasmazytoide dendritische Zellen markieren. Bei den Zellen der vorliegenden Arbeit, die Nabelschnurmonozyten entstammten, wurde CD303 von nur wenigen der Zellen exprimiert, von diesen jedoch zum Teil recht ausgeprägt. Auch bei den zum Vergleich angezüchteten Makrophagenkulturen war eine Expression bei den polarisierten CD14⁺ Zellen zu beobachten.

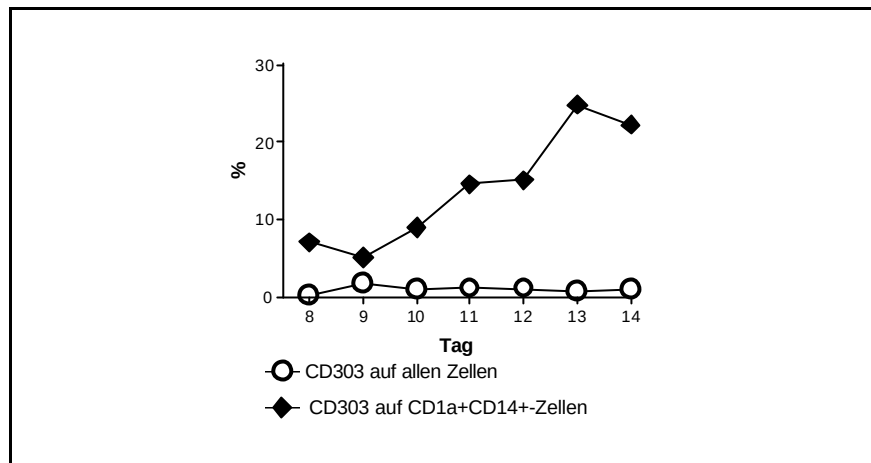


Abbildung 14: CD303-Expression auf unreifen dendritischen Zellen:

Die CD303-Expression war bei den unreifen dendritischen Zellen, die wie in der ersten sieben Kulturtagen GM-CSF, SCF und TNF- α als Kulturzusätze erhielten, in Bezug auf die Gesamtpopulation dieser Kultur vernachlässigbar gering, stieg jedoch bei der Subpopulation der CD1a⁺CD14⁺-Zellen im Verlauf der Beobachtungen auf 25%.

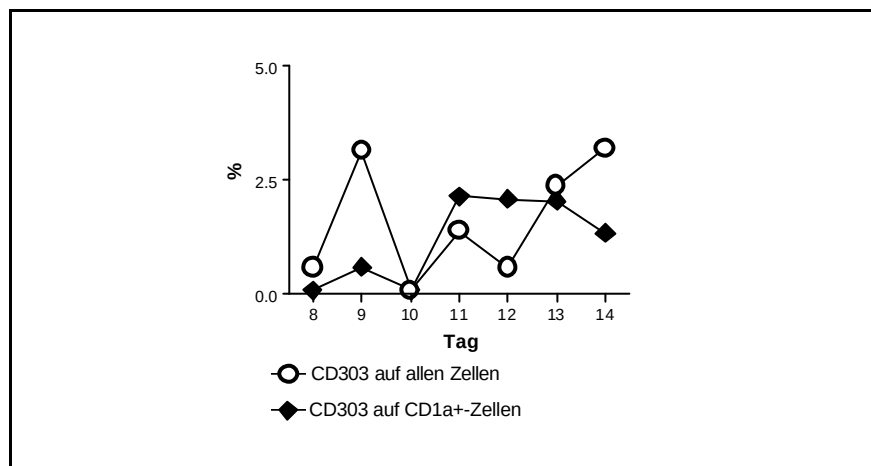


Abbildung 15: CD303-Expression auf reifen dendritischen Zellen:

Die reifen dendritischen Zellen entstammten Kulturen, die zusätzlich mit IL -4 nachstimuliert worden waren. CD303 wies hier trotz einer Zunahme der CD1a⁺-Zellen eine späte und nicht über 2,5% steigende Expression auf. Die Expression blieb in Bezug auf die Gesamtpopulation durchweg unter 5% (repräsentative Darstellung, aus sechs Untersuchungen).

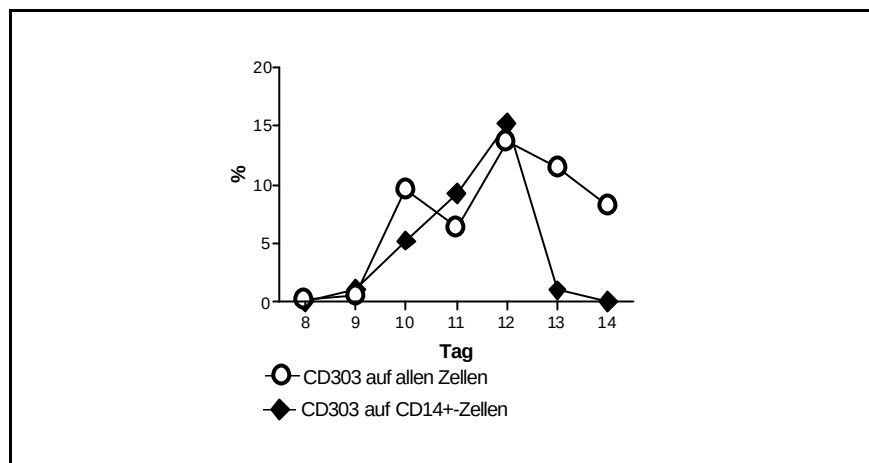


Abbildung 16: CD303-Expression auf Makrophagen:

Die Makrophagen, die nach Zugabe von M-CSF generiert wurden, konnten durch die Expression des für sie typischen CD14-Oberflächenmarkers als solche erkannt werden. Bei allen Zellen dieser Kulturen stieg die CD303-Expression nicht über 15% und fiel bei den CD14⁺-Zellen ab dem 12. Beobachtungstag nach einem kurzzeitigen Anstieg wieder gegen Null (repräsentative Darstellung, aus sechs Untersuchungen).

3.2.4. Der Oberflächenmarker CD304 wurde ubiquitär exprimiert

CD304 wurde von fast allen Subpopulationen ausgeprägt exprimiert. Bei den unreifen myeloiden dendritischen Zellen stieg seine Expressionskurve schnell bis auf 75% der Gesamtpopulation. Auf CD1a⁺-Zellen nahmen die Bindungsstellen auf bis zu 40% der Zellen zu, bei den unreifen CD1a⁺CD14⁺-Zellen sogar bis zu 80%. Die Expression auf CD14⁺-Zellen blieb mit 75-80% konstant hoch. CD304 wurde immerhin auf gut einem Drittel der CD1a⁻CD14⁻-Zellen exprimiert.

In Bezug auf die Gesamtpopulationen der polarisierten myeloiden dendritischen Zellen wurde CD304 abnehmend auf bis zu 35% exprimiert. Dabei fiel die Expression auf den CD1a⁺-Zellen (den Zielzellen dieser Kulturen) bis unter 10%.

Bei den CD1a⁺CD14⁺- (unreife myeloide dendritische Zellen) und den CD14⁺-Zellen verminderte sich die Expression ebenfalls erkennbar. Auch bei den CD1a⁻CD14⁻-Zellen nahmen die Bindungsstellen ab.

Bei den Makrophagen wurde CD304 in Bezug auf die Gesamtpopulation deutlich abfallend exprimiert. Hier sank der Anteil der exprimierenden CD1a⁺CD14⁺- und der CD14⁺-Zellen jeweils auf ca. 10%.

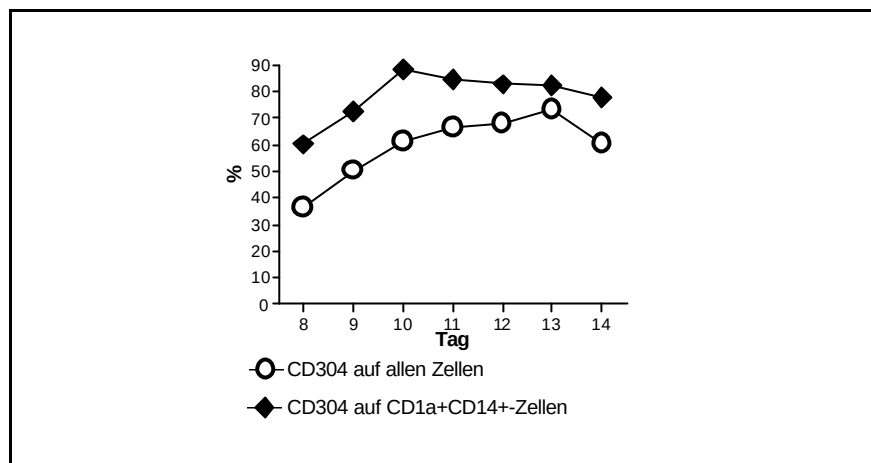


Abbildung 17: CD304-Expression auf unreifen dendritischen Zellen:

Die unreifen dendritischen Zellen wurden durch die Markierung mit Anti-CD1a- und Anti-CD14-Antikörpern erkennbar gemacht, da sie diese beiden Moleküle coexprimieren. CD304 wies bei den unreifen dendritischen Zellen eine durchweg hohe Expression sowohl bei der Subpopulation der CD1a⁺CD14⁺-Zellen sowie der Gesamtpopulation dieser Kultur auf (repräsentative Darstellung, aus sechs Untersuchungen ausgewählt).

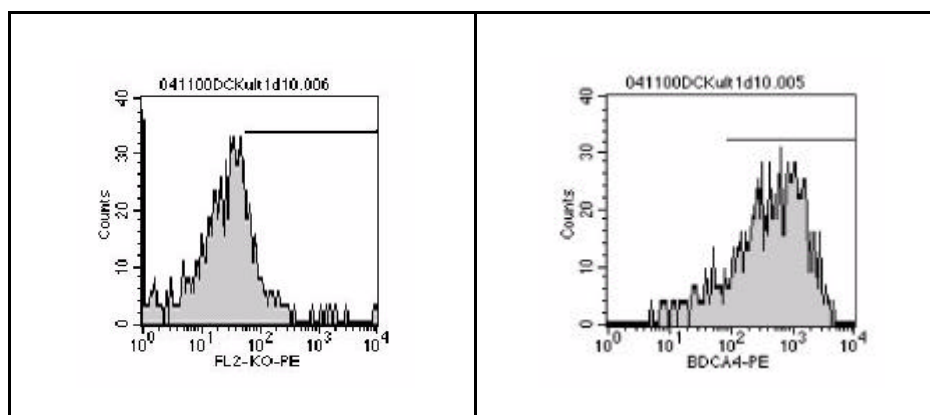


Abbildung 18: CD304-Expression der unreifen dendritischen Zellen:

Um die Expression der Oberflächenmoleküle quantifizieren zu können, mußte bei der durchflußzytometrischen Untersuchung zuerst die Eigenfluoreszenz der Zellen bestimmt und von den ermittelten Werten abgezogen werden. Hier gezeigt ist die Kontrollmessung der Eigenfluoreszenz (links) und die CD304-Expression bei den Kulturen der unreifen dendritischen Zellen (CD1a⁺CD14⁺; rechts). Dieser Marker wurde in allen Kulturen ubiquitär exprimiert.

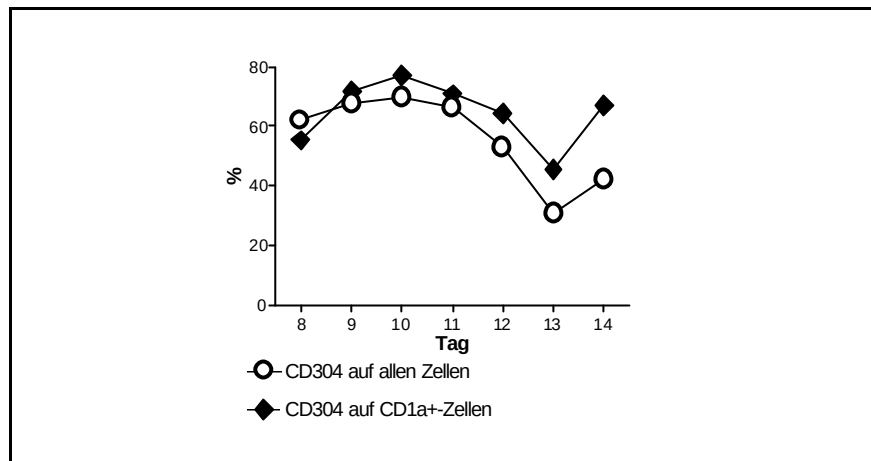


Abbildung 19: CD304-Expression auf reifen dendritischen Zellen:

Die reifen dendritischen Zellen wurden in der durchflußzytometrischen Untersuchung mit den Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD1a und CD14 markiert. CD304 zeigte auch bei diesen $CD1a^{+}CD14^{+}$ -Zellen eine ausgeprägte ubiquitäre Expression. (repräsentative Darstellung, aus sechs Untersuchungen ausgewählt).

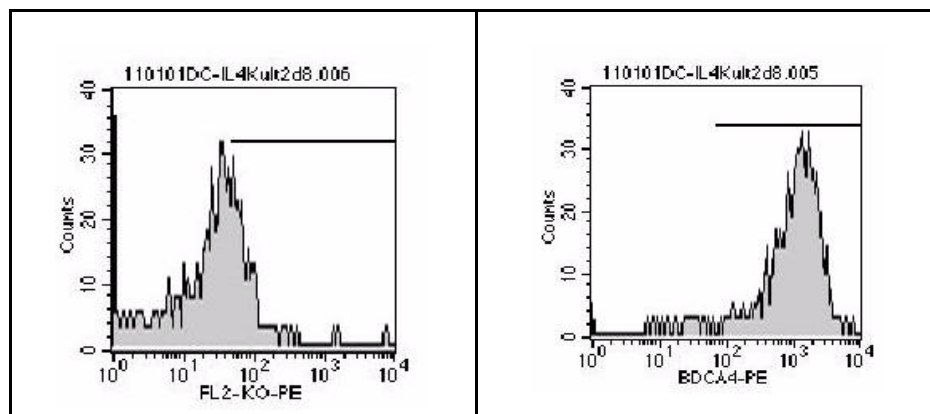


Abbildung 20: CD304-Expression auf reifen dendritischen Zellen (Histogramm):

Die Antikörper gegen die interessierenden Oberflächenmoleküle waren mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die in der durchflußzytometrischen Untersuchung aufgrund ihres charakteristischen Streuverhaltens die Aquisition der Daten ermöglichten.

Der neue Oberflächenmarker CD304 (NP-1), der an dendritischen Zellen aus Peripherblut spezifisch von plasmazytoiden Zellen exprimiert wurde, zeigte auch bei den reifen dendritischen Zellen ($CD1a^{+}$ -Zellen) eine ausgeprägte Expression.

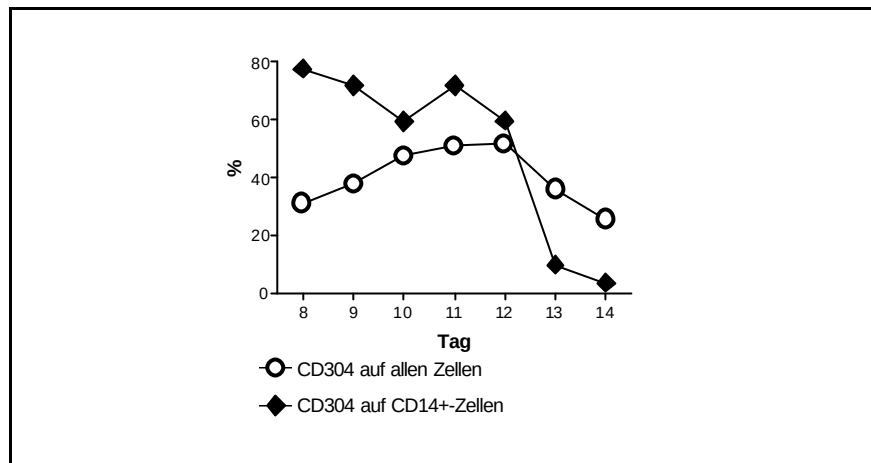


Abbildung 21: CD304-Expression auf Makrophagen:

Die Makrophagen wurden entsprechend den unreifen und reifen dendritischen Zellen mit spezifischen Antikörpern markiert, um die Expression der interessierenden Oberflächenmarker quantitativ nachweisen zu können. Bei den Makrophagen fiel die CD304-Expression im Verlauf der Messungen von Tag 8 bis Tag 14 nach einem leichten Anstieg wieder ab (repräsentative Darstellung, aus sechs Untersuchungen ausgewählt).

3.3. Die Expression der neuen Oberflächenmarker auf den CLA⁺-Zellen der Kulturen

Die CLA⁺-Zellen der Kulturen der drei zu beobachtenden Zellarten exprimieren das sogenannte „skin-homing molecule“ aktivierter Lymphozyten.

In den Kulturen der unreifen myeloiden dendritischen Zellen zeigten nur wenige Zellen, drastisch abnehmend bis unter 3% (Tag 14) die Eigenschaft der CLA-Expression. Diese Zellen exprimierten CD1c recht deutlich, CD141 und CD303 vernachlässigbar gering, jedoch CD304 relativ ausgeprägt auf fast der Hälfte der Zellen.

Bei den reifen myeloiden dendritischen Zellen, die mit IL-4, TNF- α und GM-CSF nachstimuliert wurden, wurde CLA zunehmend auf bis zu 20% der Zellen exprimiert. Bei diesen Zellen zeigte sich eine deutliche Zunahme der CD1c-Bindungsstellen. CD303 und CD141 wurden wiederum praktisch nicht und CD304 als ubiquitärer Marker von bis zu 3/4 der CLA⁺-Zellen getragen.

Die Makrophagen der Vergleichskulturen, die mit M-CSF nachstimuliert wurde, exprimierten CLA nur gering, und auch dies fiel rasch gegen Null. Alle vier Oberflächenmarker wurden im Verlauf steigend von etwa der Hälfte der CLA⁺-Zellen exprimiert, was jedoch in Anbetracht der sehr geringen Zellzahlen keine nennenswerte Aussagekraft hat.

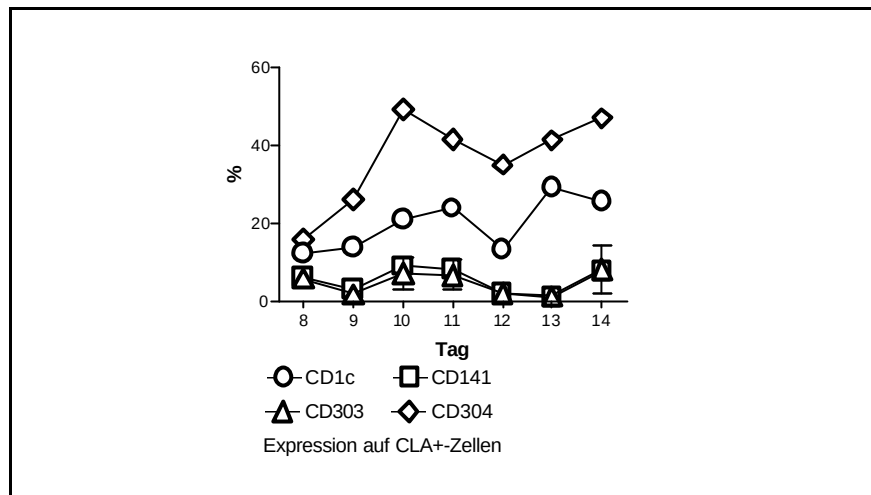


Abbildung 22: Expression der vier Oberflächenmarker auf CLA⁺ unreifen dendritischen Zellen:

Die Expression der vier Oberflächenmarker bei den CLA⁺-Zellen der ersten Kultur zeigt, daß die im Verlauf von ca. 10% auf 5% der Gesamtzellzahl abfallenden CLA⁺-Zellen die Marker tragen. Dies ist jedoch aufgrund der geringen Zellzahl nur tendenziell verwertbar. Die Coexpression von CD1c und CD304 zeichnet sich deutlich ab (Repräsentatives Ergebnis, aus sechs Untersuchungen).

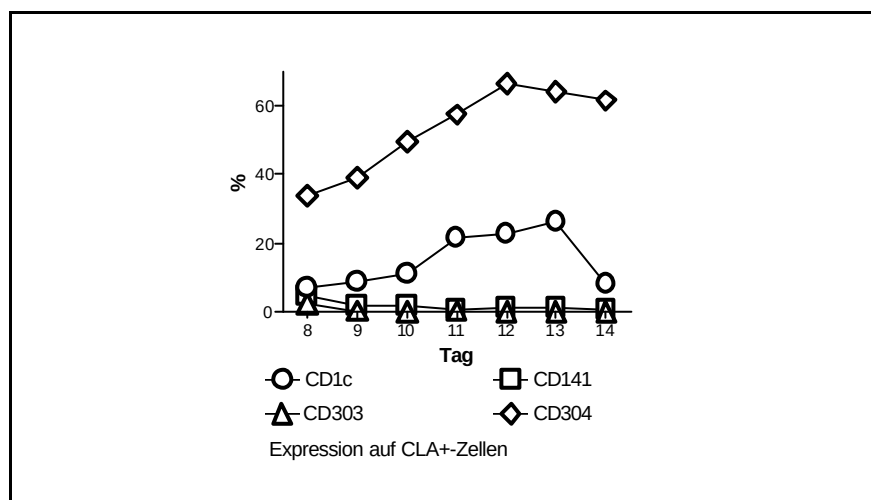


Abbildung 23: Expression der vier Oberflächenmarker auf CLA⁺ reifen dendritischen Zellen:

Bei den reifen dendritischen Zellen zeigte sich, daß die im Verlauf der Messungen von d8-14 von ca. 5% auf >20% der Gesamtzellzahl ansteigenden CLA⁺-Zellen den ubiquitären Marker CD304 bis zu 60%, CD1c immer noch bis zu 20% und CD303 und CD141 nur gering exprimieren (Repräsentatives Ergebnis, aus sechs Untersuchungen ausgewählt).

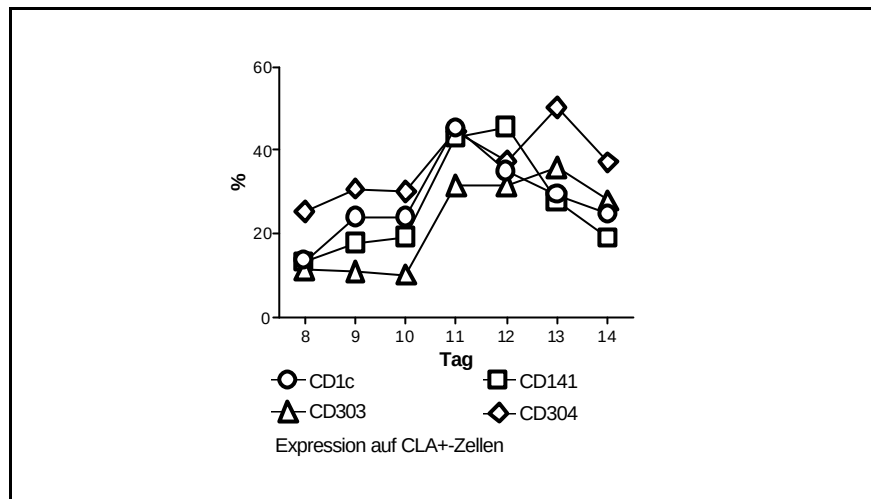


Abbildung 24: Expression der vier Oberflächenmarker auf CLA⁺ Makrophagen:

Bei den Makrophagen (Nachstimulation mit M-CSF) zeigte sich, daß die im Verlauf der Beobachtung von ca. 5% gegen Null der Gesamtzellzahl sinkenden CLA⁺-Zellen die neuen Oberflächenmarker zwar exprimieren, diese Ergebnisse jedoch auf geringen Zellzahlen basieren und daher nur eingeschränkt aussagekräftig sind (Repräsentatives Ergebnis, aus sechs Untersuchungen ausgewählt).

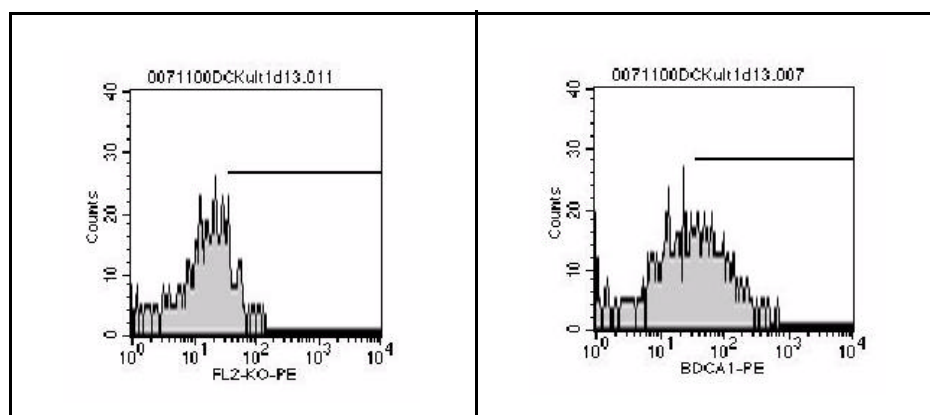


Abbildung 25: CD1c-Expression auf CLA⁺ unreifen dendritischen Zellen:

Die durchflußzytometrische Untersuchung ergab primär charakteristische Histogramme, die das Ausmaß der Expression anschaulich darstellten. Die so nach Abzug der durch eine Leerprobe festgestellten Eigenfluoreszenz der Zellen ermittelte Stärke der Expression in Relation zur Anzahl der exprimierenden Zellen stellten die Grundlage für die weitere Auswertung der gewonnenen Daten.

CD1c wird von den CLA⁺-Zellen in den Kulturen der unreifen dendritischen Zellen gering exprimiert.

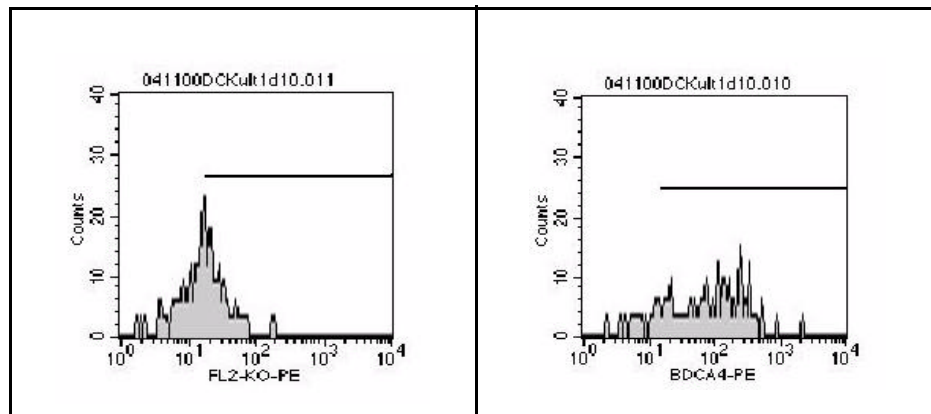


Abbildung 26: CD304-Expression auf CLA⁺ unreifen dendritischen Zellen.

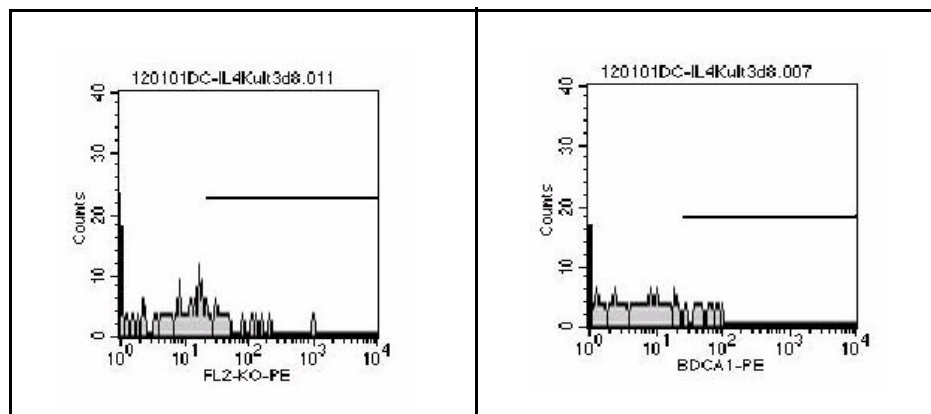


Abbildung 27: CD1c-Expression auf den CLA⁺ reifen dendritischen Zellen

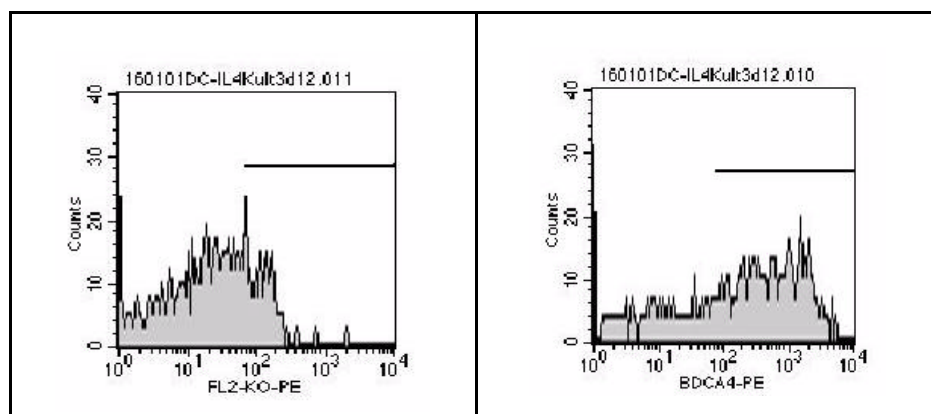


Abbildung 28: CD304-Expression auf den CLA⁺ reifen dendritischen Zellen:

Abb. 26 bis 28: Die Histogramme der durchflußzytometrischen Untersuchung zeigen deutlich die Expression der markierten Oberflächenmoleküle. Die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Zellen passieren einzeln hintereinander angeordnet gerichtete Laserstrahlen definierter Wellenlänge und können so anhand der Brechungseigenschaften charakterisiert werden.

3.4. Tabellarische Zusammenfassung der Beobachtungsergebnisse für CD1c, CD141, CD303 und CD304 an myeloiden dendritischen Zellen aus Nabelschnurblut-Stammzellen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Expression der neuen Oberflächenmarker CD1c, CD141, CD303 und CD304 durch stammzellgenerierte dendritische Zellen verschiedener Reifestadien und Makrophagen werden in der nachfolgenden Tabelle noch einmal vereinfachend zusammengefaßt. Diese vier neuen Oberflächenantigene zeigen auf myeloiden dendritischen Zellen, welche aus Nabelschnurblut angezüchtet wurden, keine so charakteristische Verteilung, wie sie auf dendritischen Zellen aus Peripherblut beschrieben wurde. Doch ist eine gewisse Spezifität für dendritische Zellen erkennbar.

Tabelle 1: Expression der neuen Oberflächenmarker CD1c, CD141, CD303 und CD304 durch stammzellgenerierte dendritische Zellen verschiedener Reifestadien und Makrophagen.

Kulturen	CD1c (BDCA-1)	CD141 (BDCA-3)	CD303 (BDCA-2)	CD304 (BDCA-4)	Marker
Unreife DC	+	(+)	++	+++	CD1a ⁺ CD14 ⁺
Reife DC	++	+	(+)	+++	CD1a ⁺
Makrophagen	(+)	(+)	(+)	++	CD14 ⁺
Unreife DC/CLA ⁺	(+)	-	-	+	CD1a ⁺ CD14 ⁺
Reife DC/CLA ⁺	(+)	-	-	+	CD1a ⁺
Makrophagen/CLA ⁺	-	-	-	-	CD14 ⁺

4. Diskussion

Die Bedeutung dendritischer Zellen bei der Initiierung und Regulation zellulärer immunologischer Reaktionen ist in den letzten Jahren zunehmend klarer geworden. Sie spielen z.B. in der Pathophysiologie von Infektions- und Autoimmunerkrankungen eine entscheidende Rolle. Den Subpopulationen dendritischer Zellen kommen hierbei unterschiedliche Aufgaben zu.

Es liegt deshalb nahe zu versuchen, dendritische Zellen durchflußzytometrisch zu charakterisieren. Zunächst gelang dies allerdings nur unter Zuhilfenahme mehrerer Marker, die von dendritischen Zellen coexprimiert werden. Seit einigen Jahren sind Oberflächenmarker bekannt, die für dendritische Zellen spezifisch sein und eine einfache Markierung ermöglichen sollen. Insbesondere CD1c, CD141, CD303 und CD304 werden zur Untersuchung von Proben des peripheren Bluts, und zunehmend auch von Gewebeproben benutzt. Die Spezifität der genutzten Marker ist zwar hinreichend für dendritische Zellen des peripheren Blutes, jedoch nur unzureichend für andere Differenzierungsphasen nachgewiesen worden. Die Anzucht dendritischer Zellen aus Stammzellen ermöglicht die Analyse verschiedener Reifungsstufen und unterschiedlicher Reifungswege. Unter dem Einfluß von M-CSF reifen CD14⁺ Makrophagen, unter dem Einfluß von IL-4 differenzierte CD1a⁺ dendritische Zellen und unter dem alleinigen Einfluß von GM-CSF und TNF- α , ohne andere zusätzliche Zytokine, CD1a⁺CD14⁺ Vorläufer dendritischer Zellen aus.

Es stellt sich die Frage, ob und in welchem Ausmaß die Marker CD1c und CD141 auf myeloiden dendritischen Zellen und ihren Vorläufern exprimiert werden, ob diese Marker auch von Makrophagen getragen werden, die aus den gleichen Stammzellen angezüchtet wurden und ob die Marker CD302 und CD303 wirklich, wie behauptet, für plasmazytoide dendritische Zellen spezifisch sind.

4.0.1. CD1c wird von myeloiden dendritischen Zellen exprimiert

Der Oberflächenmarker CD1c wurde bei den stammzellgenerierten dendritischen Zellen vor allem von unter dem Einfluß von IL-4 gereiften CD1a⁺ dendritischen Zellen, geringer auch von den unreifen CD1a⁺CD14⁺ Zellen exprimiert. Dies entspricht den Beobachtungen von Dzionek et al., die zeigen konnten, daß dendritische Zellen aus CD34⁺-hämatopoetischen Vorläuferzellen, die allerdings nur zu einem Zeitpunkt untersucht worden waren, sowohl CD1c als auch CD1a trugen.

Sie berichteten zudem, daß CD1c eine Identifizierung dendritischer Zellen myeloider Herkunft erlaubt. Dies konnten wir in der vorliegenden Arbeit bestätigen. Die peripherem Blut entstammenden dendritischen Zellen, die von Dzionek et al. ausführlich untersucht worden sind, coexprimierten jedoch kein CD1a, sodaß CD1c sowohl zur Identifizierung von peripheren myeloiden dendritischen Zellen als auch den gewebsständigen Langerhanszellen geeignet ist. Allerdings findet sich CD1c auch auf einer Subpopulation von peripheren B-Zellen, sodaß zur eindeutigen Identifizierung Doppelfärbungen mit einem B-Zellmarker notwendig sind.

4.0.2. Die CD141-Expression konnte für myeloide dendritische Zellen bestätigt werden

CD141 wurde besonders deutlich auf frühen Entwicklungsstufen der angezüchteten CD14⁺ monozytoiden Zellen exprimiert, die dann jedoch mit der weiteren Ausreifung zu Makrophagen dieses Antigen wieder verlieren. Auf den unreifen CD1a⁺CD14⁺-Zellen fand sich eine sehr geringe Expression. Bei den reifen CD1a⁺ Zellen stieg diese jedoch bis auf 50% an. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den von Dzionek berichteten Ergebnissen, die zeigen, dass CD141 von dendritischen Zellen myeloider Herkunft getragen wird [31]. Allerdings zeigen die vorliegenden Ergebnisse ein heterogenes Expressionsmuster einerseits auf Makrophagenvorläufern und andererseits auf ausdifferenzierten dendritischen Zellen, sodaß nicht von einer einheitlichen CD141⁺ Population gesprochen werden kann.

4.0.3. Die CD303-Expression auf stammzellgenerierten dendritischen Zellen war gering

Das Antigen CD303 wurde unter den drei untersuchten Kulturbedingungen nur von einem geringen Anteil der voll ausdifferenzierten CD1a⁺-Zellen, jedoch von immerhin 25% der unreifen CD1a⁺CD14⁺ dendritischen Zellen exprimiert.

Dies steht im Gegensatz zur Expression auf dendritischen Zellen des peripheren Bluts. Dzionek et al. zeigten, daß aus dem peripheren Blut isolierte CD303⁺-Zellen kein CD1a und CD14 exprimieren, jedoch Eigenschaften plasmazytoider dendritischer Zellen aufwiesen. Zudem hatten sie auch CD34⁺-Vorläuferzellen und monozytengenerierte dendritische Zellen untersucht und festgestellt, daß beide weder CD303 noch CD141 tragen [31].

Die Ursache dieser Diskrepanz kann natürlich in der unterschiedlichen Herkunft der dendritischen Zellen begründet sein, und die vorgestellten Ergebnisse könnten in-vitro Artefakte darstellen. Es ist jedoch eher wahrscheinlich, daß die in der vorliegenden Arbeit gewählten Ausreifungsbedingungen die physiologischen Bedingungen zumindest einiger Organe widerspiegeln. Dzionek benutzt zur Anzucht dendritischer Zellen TGF- β , das von Epithelien gebildet wird, während die in dieser Arbeit angezüchteten CD1a⁺CD14⁺-dendritischen Zellen, die die unerwartet hohe CD303 Expression zeigten, ohne TGF- β angezüchtet wurden und eher interstitiellen dendritischen Zellen in Lymphknoten entsprechen [19].

Daß die myeloiden dendritischen Zellen CD303 tragen, führt aber zu der Frage, ob die Markierung mit monoklonalen anti-CD303-Antikörpern wirklich immer die gewünschten Zellen identifiziert. Eine ganze Reihe von Veröffentlichungen sind erschienen, die sich besonders auf die Expression von CD303 stützen. So wurde z.B. die Verwendung von anti-CD303-Antikörpern zur Identifikation plasmazytoider dendritischer Zellen bei allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantationen untersucht [2]. Immer häufiger werden dendritische Zellen mit anti-CD303-Antikörpern zur Untersuchung entzündlicher und autoimmuner Geschehen markiert [16]. So wird auch berichtet, daß in Läsionen allergischer Kontaktdermatitis mit Hilfe von anti-CD303-Antikörpern eine erstaunlich große Anzahl vermeintlich plasmazytoider dendritischer Zellen nachgewiesen wurde. Diese wurden in enger Nachbarschaft zu CD56⁺-NK-Zellen gefunden, was eine funktionelle In-

teraktion dieser beiden Zelltypen bedeuten könnte [10]. Doch stellt sich die Frage nach der Zuverlässigkeit der Ergebnisse und somit ihrem Nutzen als Grundlage für nähere Untersuchungen.

Die nachgewiesene Expression von CD303 auf myeloiden dendritischen Zellen eröffnet jedoch auch neue Möglichkeiten, da CD303 als Molekül funktionelle Eigenschaften besitzt. Dzionek et al. beschrieben eine schnelle, mit einer der Endozytose ähnlichen Kinetik erfolgende Internalisation des Anti-BCDA-Antikörpers nach Bindung an CD303 mit darauffolgender effektiver Präsentation des Antikörpers gegenüber T-Zellen. Dies ist ein wichtiger Hinweis auf die mögliche Rolle von CD303 in der Liganden-Internalisation und Antigen-Präsentation [31, 33]. Diese Beobachtung könnte zudem in Zukunft derart genutzt werden, daß die zügige Internalisation und Präsentation eines Antigens gezielt herbeigeführt wird. Sollen dendritische Zellen z.B. zur spezifischen Immunisierungsstimulation genau definierte Antigene präsentieren, kann die Bereitstellung entsprechend präparierter Zellen in kurzer Zeit erfolgen. Das kann in Zukunft unter Umständen sogar wichtige therapeutische Bedeutung haben.

Sehr vielversprechend ist auch die mehrfach beschriebene Möglichkeit der effizienten Suppression einer Interferon- α -Freisetzung nach Inkubation reifer plasmazytoider dendritischer Zellen mit anti-CD303-mAb [31, 33]. Auch Rönnblom et al. [85] beschrieben dieses Phänomen, welches in der gezielten Unterdrückung der für plasmazytoide dendritische Zellen charakteristischen Interferon- α -Freisetzung besteht und bei entzündlichen (autoimmunen) Geschehen einen therapeutischen Nutzen versprechen kann. Hier werden z.B. für Patienten mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) aufgrund der in vitro nachgewiesenen potenten Interferon- α -Inhibition nach CD303-Antikörperbindung Überlegungen zu einem möglichen therapeutischen Nutzen angestellt [17, 85].

Ein Signalweg via CD303 könnte eine Rolle im Wechsel von der Interferon- α/β zur Interleukin-12-kontrollierten Immunantwort spielen. Das gezielte Triggern dieses Wechsels mittels anti-CD303-mAb inhibiert beträchtlich die Sekretion von Interferon- α/β durch plasmazytoide dendritische Zellen und fördert dadurch die Interleukin-12-Produktion.

Eine mögliche funktionelle Beeinflussung nicht nur der plasmazytoiden sondern auch der myeloiden dendritischen Zellen könnte deshalb die Zahl der potentiellen Einsatzmöglichkeiten von anti-CD303 erhöhen.

4.0.4. Die CD304-Expression auf aus Nabelschnurblutstammzellen angezüchteten dendritischen Zellen war ubiquitär verteilt

Die Expression von CD304 zeigte sich auf fast allen Subpopulationen der untersuchten Kulturen myeloider dendritischer Zellen und Makrophagen.

CD304 wird mittlerweile aber zur Isolation und Identifikation plasmazytoider dendritischer Zellen eingesetzt. Im Gegensatz zu CD303 ist bei einer Markierung mit anti-CD304-Antikörpern keine Rezeptorinternalisation oder Modifikation der Zellfunktionen beschrieben worden. Dieser Marker sollte genauer auf seine Einsatzfähigkeit bei der Identifikation plasmazytoider dendritischer Zellen hin untersucht werden, da es von Vorteil ist, wenn die markierten Zellen weiterhin ihre Funktionsfähigkeiten behalten.

2002 beschrieben Dzionek et al. ihre Beobachtung, daß CD304 identisch sei mit Neuropilin-1 (NP-1) [32]. NP-1 ist ein neuronaler Rezeptor für axonale Wachstumsföhrungs-Faktoren in der Entwicklung des Nervensystems. Es gehört der Klasse-3 Semaphorin-Subfamilie an und ist ein Rezeptor auf endothelialen und Tumorzellen für den heparin-bindenden vaskulären Wachstumsfaktor (VEGF-A). In Blut und Knochenmark wird NP-1 ausschließlich auf plasmazytoiden DC, hingegen z.B. in den Tonsillen auch auf einigen anderen Zellen, besonders follikulären B-Helfer-Memory-T-Zellen (T(FH)) exprimiert [7, 32, 42].

So kommt CD304 in einem ganz anderen Licht eine Bedeutung zu. Es kann in Forschung und Diagnostik zur Identifikation der exprimierenden Zellen genutzt werden. Dies ist insofern attraktiv, als daß sich aktuell die Beweise für eine Rolle von NP-1 im Immunsystem mehren. Wahrscheinlich vermittelt es Zell-Interaktionen zwischen dendritischen Zellen und T-Lymphozyten und ist ein essentieller Faktor für die primäre Immunantwort. Diese Ergebnisse können als Hinweis auf die durch die embryonale bzw. phylogenetische Entwicklung bedingte molekulare Ähnlichkeit des Nervensystems mit dem Immunsystem genutzt werden. So eröffnen sich auch hier neue Möglichkeiten zur Modulation der Immunantwort [7].

4.1. Die Expression der vier Oberflächenmoleküle durch Makrophagen

Dzionic et al. haben die Expression der neuen Oberflächenmarker nur auf dendritischen Zellen untersucht. Um die Spezifität für diese Immunzellen zu untermauern, wurden in der vorliegenden Arbeit neben Vorläuferzellen und reifen dendritischen Zellen aus denselben CD133⁺-Stammzellen auch Makrophagen kultiviert.

Bei den Makrophagen (Nachstimulation mit M-CSF) sinkt die Expression aller vier Marker im Verlauf der Untersuchungen vom achten bis zum 14. Kulturtag deutlich ab. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können somit die zuvor veröffentlichte Beobachtung, daß die neuen Oberflächenmarker relativ spezifisch von dendritischen Zellen getragen werden, unterstreichen.

4.2. Die Expression von CD1c, CD141, CD303 und CD304 auf CLA⁺-Zellen

Das „skin homing molecule“ CLA (cutaneous lymphocyte antigen), wird von allen hämatopoetischen Zellen (besonders Leukozyten) - so auch von dendritischen Zellen - exprimiert.

Die Oberflächenmarker CD1c, CD303, CD141 und CD304 (NP-1) lassen sich nur zu Beginn der Messungen in sehr geringer Ausprägung an den reifen CLA-tragenden Zellen der Kulturen dieser Arbeit nachweisen. Im Laufe der Untersuchungen dieser Zellen verminderten sich diese Eigenschaften für CD303 und CD141 vom achten bis 14. Kulturtag gegen Null, und auch die Oberflächenantigene CD1c sowie CD304 wurden nur gering exprimiert. Dzionic et al. zeigten für dendritische Zellen aus peripherem Blut, daß CLA deutlich von CD303⁺-dendritischen Zellen und sehr ausgeprägt von CD141⁺- und CD1c⁺-dendritischen Zellen des peripheren Blutes exprimiert wird [31]. Auch hier wurden die Zellen nicht aus Nabelschnurblut-Stammzellen wie in der vorliegenden Arbeit angezüchtet, was wie in den oben beschriebenen Ergebnissen zu den phänotypischen Unterschieden in der Expression der Oberflächenmarker geführt haben könnte.

4.3. Zusammenfassung

Die Zellen, deren Anzucht und Untersuchung diese Arbeit zugrundeliegt, wurden mittels hochspezifischer CD133⁺-markierten Magnetobeads aus mononukleären Zellen des Nabelschnurbluts selektiert und mit Reifungsfaktoren in drei verschiedenen Kulturen gezogen.

Eine während dieser Selektion durchgeführte durchflußzytometrische Kontrolluntersuchung, die den erlangten Reinheitsgrad der erwünschten CD133⁺-Zellpopulation durchflußzytometrisch ermittelte, ergab eine Reinheit von 98,4%, weitere Untersuchungen im Laufe der Arbeit ergaben ähnliche Werte. So konnte bestätigt werden, daß für die Beobachtungen dieser Arbeit die richtigen Zielzellen kultiviert wurden.

Die gewonnenen Zellen wurden in bewährter Weise [35] mit TNF- α , SCF und GM-CSF versetzt und sieben Tage lang bei 37 °C inkubiert. Daraufhin erfolgte eine Nachstimulation mit polarisierenden Faktoren, um jeweils unreife und reife dendritische Zellen und Makrophagen anzuzüchten, die weiter untersucht wurden.

Um Kulturen mit unreifen myeloiden dendritischen Zellen zu erhalten, wurden die auch in der ersten Woche zugesetzten Zytokine TNF- α und GM-CSF verwendet. Um eine weitere Reifung der myeloiden dendritischen Zellen zu erreichen, wurden weiteren Kulturen am achten Tag Interleukin-4, TNF- α und GM-CSF zugesetzt. Außerdem wurden weitere Stammzellkulturen mit M-CSF nachstimuliert, um eine Polarisation der Zellen zu Makrophagen zu erreichen.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse weisen darauf hin, daß die zuvor beschriebene Möglichkeit der Differenzierung dendritischer Zellen aus peripherem Blut bei aus hämatopoetischen Stammzellen *in vitro* gezüchteten dendritischen Zellen möglicherweise nicht mit der gleichen Zuverlässigkeit anwendbar ist. Für die vorliegende Arbeit wurden myeloide dendritische Zellen aus CD133⁺-Stammzellen angezüchtet und untersucht. Somit ist eine Aussage zur Expression angeblich spezifisch plasmazytoider Marker auf myeloiden Zellen möglich. Jedoch kann keine Beurteilung der angeblich spezifisch myeloide Zellen markierenden Antikörper in Bezug auf eine mögliche Bindung an plasmazytoiden dendritischen Zellen erfolgen.

Da CD303 und CD304 (laut Dzionek et al. spezifisch für plasmazytoide dendritische Zel-

len) auf den stammzellgenerierten myeloiden dendritischen Zellen der vorliegenden Arbeit gefunden wurden, ist es wahrscheinlich abhängig von der Herkunft und Reifungsgrad der untersuchten Zellen, ob diese Oberflächenmoleküle auch von den myeloiden dendritischen Zellen exprimiert werden.

Es liegt nahe, daß die Anzuchtbedingungen in vitro trotz bewährter Methoden den komplexen physiologischen Bedingungen nicht genau entsprechen. Dies gilt besonders, wenn unterschiedliche Stammzellquellen genutzt werden. Auch könnten theoretisch Unterschiede in den Kulturbedingungen der vorliegenden Arbeit Artefakte hervorgerufen haben. Es ist jedoch eher wahrscheinlich, daß die Ergebnisse dieser Arbeit aufgrund der frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen, die im Verlauf ihrer Reifung betrachtet wurden, die physiologischen Differenzierungswege dendritischer Zellen in vivo widerspiegeln. Die physiologische Reifung erfolgt in unzugänglichen Kompartimenten wie dem Knochenmark und den peripheren Geweben und ist somit für Untersuchungen nicht ohne weiteres zugänglich. Daher werden meist dendritische Zellen aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes erwachsener Spender verwendet.

Diese Arbeit zeigt anhand der ubiquitären Expression der neuen Oberflächenantigene CD1c, CD141, CD303 und CD304 (NP-1) einen weiteren Beweis für die Vielseitigkeit dieser stammzellgenerierten Zellen früher Entwicklungsstufen. Eine eindeutige Identifizierung dendritischer Zellen myeloider versus plasmazytoider Herkunft, auch in Bezug auf ein bestimmtes Reifungsstadium konnte im Rahmen der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Jedoch konnte ausgeschlossen werden, daß diese Oberflächenantigene von den zum Vergleich angezüchteten Makrophagen exprimiert werden, die den gleichen CD133⁺-Zellen entstammten wie die beobachteten dendritischen Zellen.

Die Ergebnisse der Experimente der vorliegenden Arbeit können zu weiteren Untersuchungen führen:

1. Die hier gemachte Beobachtung der unzuverlässigen Unterscheidung myeloider und plasmazytoider dendritischen Zellen, die aus Nabelschnurblut-Stammzellen generiert wurden, führt zu der Frage nach der Ursache und möglichen Auswirkungen. Es kann z.B. bedeuten, daß unter bestimmten Vorstellungen beurteilte Experimente anderer Studien neu zu betrachten sind. Zur Verbesserung des Verständnisses der komplexen

einflußnehmenden Mechanismen müssen die erforderlichen physiologischen Umgebungsbedingungen der dendritischen Zellen noch wesentlich detaillierter untersucht und dann vor allem auch *in vitro* mit größerer Sicherheit authentisch nachgebildet werden können. Erst dann kann die Forschung dazu übergehen, Beobachtungen als gesicherte Erkenntnis auf *in vivo* Bedingungen zu übertragen.

2. Interessant wäre des Weiteren eine der vorliegenden Arbeit folgende Untersuchung, ob eine durch anti-CD303-Antikörper induzierte Modifikation der Zytokinproduktion (ähnlich der Interferon- α -Suppression) bei myeloiden dendritischen Zellen aus Nabelschnurblut-Stammzellen ebenfalls stattfindet. Dies könnte z.B. im Rahmen einer frühzeitigen Intervention (u.a. bei autoimmun bedingten Erkrankungen) zu der Entwicklung neuer Therapieansätze führen.
3. In Bezug auf die rasch erfolgende mAb-Internalisation nach Inkubation mit CD303 gilt es nun herauszufinden, ob und wann während der Differenzierung ein entsprechender Mechanismus auch bei myeloiden unreifen bzw. reifen dendritischen Zellen aus Nabelschnurblut-Stammzellen zu beobachten ist. Auch hieraus könnte ein weiterer diagnostischer (z.B. zur Charakterisierung bestimmter Reifestadien dendritischer Zellen) oder therapeutischer Nutzen gezogen werden. So kann die Inkubation dendritischer Zellen mit anti-CD303-Antikörpern zu einer gezielten Rezeptorinternalisation führen. In deren Folge würde die Reifung und Migration und schließlich die Ag-Präsentation gegenüber T-Lymphozyten zur Induktion der erwünschten Immunreaktion gezielt beschleunigt.
4. Auch die Rolle von CD304 / Neuropilin-1 wird in Bezug auf die Interaktion von dendritischen Zellen mit T-Zellen und die weitreichenden Netzwerke des Immunsystems detaillierter untersucht werden. In Zukunft können sich auch aus diesem Bereich Fragen ergeben, die die stammzellgenerierten dendritischen Zellen zu klären helfen können.

5. Literaturverzeichnis

- [1] Ardavín, C., Martínez del Hoyo, G., Martín, P., Anjuère, F., Arias, C.F., Marín, A.R., Ruiz, S., Parrillas, V., Hernández, H. (2001) Origin and differentiation of dendritic cells.
Immunological Trends **22** 691-700
- [2] Arpinati, M., Chirumbolo, G., Urbini, B., Martinelli, V., Stanzani, M., Falcioni, S., Bonifazi, F., Bandini, G., Tura, S., Baccarani, M., Rondelli, D. (2002) Use of anti-BDCA-2 antibody for detection of dendritic cells type-2 (DC2) in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.
Bone Marrow Transplant **29** 887-91
- [3] Arrighi, J.F., Zubler, R., Hauser, C., Irion, O., Brouwers, N., Chapuis, B., Kindler, V. (2001) DC34⁽⁺⁾ cord blood cells expressing cutaneous lymphocyte-associated antigen are enriched in granulocyte-macrophage progenitors and support extensive amplification of dendritic cell progenitors.
Experimental Hematology **29** 1029-37
- [4] Ashman, L. (1999) The biology of stem cell factor and its receptor c-kit.
International Journal of Biochemistry and Cell Biology **31** 1037-51
- [5] Athanasas-Platsis, S., Savage, N.W., Winning, T.A., Walsh, L.J. (1995) Induction of the CD1a Langerhans cell marker on human monocytes.
Archives of Oral Biology **40** 157-60
- [6] Baey, A. de, Lanzavecchia, A. (2000) The role of aquaporins in dendritic cell macropinocytosis.
Journal of Experimental Medicine **191** 743-8
- [7] Bagnard, D. (2002) Neuropilin: From Nervous System to Vascular.
Eurekah Pubmed ISBN: 0-306-47416-6
- [8] Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., Palucka, K. (2000) Immunobiology of dendritic cells.
Annual Review of Immunology **18** 767-811
- [9] Banchereau, J., Steinman, R.M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity.
Nature **329** 245-52

- [10] Bangert, C., Friedl, J., Stary, G., Stingl, G., Kopp, T. (2003) Immuno-pathologic features of allergic contact dermatitis in humans: participation of plasmacytoid dendritic cells in the pathogenesis of the disease? *J Invest Dermatol* **121** 1409-18
- [11] Bave, U., Magnusson, M., Eloranta, M.L., Perers, A., Alm, G.V., Rönnblom, L. (2003) Fc gamma RIIa is expressed on natural interferon producoing cells (plasmacytoid denritic cells) and is required for the IFN-a production induced by apoptotic cells combined with lupus IgG. *J Immunol.* **171** 3296-302
- [12] Beissert, S., Schwarz, A., Schwarz, Th. (2006) Regulatory T-cells. *Journal of investigative Dermatology* **126** 15-24
- [13] Bell, D., Young, J.W., Bancherau, J. (1999) Dendritic cells. *Advanced Immunology* **72**: 255-324
- [14] Berg, E.L., Yoshino, T., Rott, L.S., Robinson, M.K., Warnock, R.A., Kishimoto, T.K., Picker, L.J., Butcher, E.C. (1991) The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1. *J Exp Med* **174** 1461-6.
- [15] Biragyn, A., Surenhu, M., Yang, D., Ruffini, P.A., Haines, B.A., Klyushnenkova, E., Oppenheim, J.J., Kwak, L.W. (2001) Mediators of innate immunity that target immature, but not mature, dendritic cells induce antitumor immunity when genetically fused with nonimmunogenic tumor antigens. *Journal of Immunology* **167** 6644-53
- [16] Blaszkowska, I., Rolinski, J., Gogacz, M., Kotarski, J. (2001) Identification of dendritic cell subsets in peritoneal fluid. *Ginekologia Polska* **72** 1455-9
- [17] Blomberg, S., Elorantam M.L., Magnusson, M., Alm, G.V., Ronnblom, L. (2003) Expression of the markers BDCA-2 and BDCA-4 and production of interferon-alpha by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **48** 2524-32
- [18] Bourette, R.P., Rohrschneider, L.R. (2000) Early events in M-CSF receptor signaling. *Growth Factors* **17** 155-66
- [19] Caux, C. (1998) Pathways of development of human dendritic cells. *European Journal of Dermatology* **8** 375-84

- [20] Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., Banchereau, J. (1992) GM-CSF and TNF- α cooperate in the generation of dendritic langerhans cells. *Nature* **360** 258-61
- [21] Caux, C., Liu, Y.J., Banchereau, J. (1995) Recent advances in the study of dendritic cells and follicular dendritic cells. *Immunology Today* **16** 2-4
- [22] Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Durand, I., Cella, M., Lanzavecchia, A., Bancherau, J. (1997) CD34⁺ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent pathways in response to GM-CSF plus TNF- α : II. Functional analysis. *Blood*, **90** 1458-1470
- [23] Cella, M., Sallusto, F., Lanzavecchia, A. (1997) Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Current Opinion in Immunology* **9** 10-16
- [24] Curti, A., Fogli, M., Ratta, M., Biasco, G., Tura, S., Lemoli, R.M. (2001) Dendritic cell differentiation from hematopoietic CD34⁺ progenitor cells. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* **15** 49-52
- [25] Curti, A., Fogli, M., Ratta, M., Tura, S., Lemoli, R.M. (2001) Stem cell factor and flt3 ligand are strictly required to sustain the long-term expansion of primitive CD34⁺DR-dendritic cell precursors. *Journal of Immunology* **166** 848-56
- [26] Dalloul, A.H., Patry, C., Salamero, J., Canque, B., Grassi, F., Schmitt, C. (1999) Functional and phenotypic analysis of thymic CD34⁺CD1a⁻ progenitor-derived dendritic cells: Predominance of CD1a⁺ differentiation pathway. *Journal of Immunology* **162** 5821-28
- [27] Darmochwal-Kolarz, D., Rolinski, J., Tabarkiewicz, J., Leszczynska-Gorzelak, B., Buczkowski, J., Wojas, K., Oleszczuk, J. (2003) Myeloid and lymphoid dendritic cells in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol* **132** 339-44
- [28] Dhodapkar, M., Bhardwaj, N. (2000) Active Immunization of humans with dendritic cells. *Journal of Clinical Immunology* **20** 167-174
- [29] Dittmar, K.E.J., Rohde, M., Weiß, S., Lindenmaier, W. (1998), (Zugriff Mai 2005) Genetically modified dendritic cells: A promising tool for immunotherapy. <http://bib.gbf.de/ergebnisbericht/1998>

- [30] Dworzak, M.N., Fröschl, G., Printz, D., Fleischer, C., Pötschger, U., Fritsch, G., Gadner, H., Emminger, W. (1999) Skin-associated lymphocytes in the peripheral blood of patients with atopic dermatitis: Signs of subset expansion and stimulation.
Journal of Allergy and Clinical Immunology **103** 901-6
- [31] Dzionek, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D.W., Schmitz, J. (2000) BDCA-2, BDCA-3 and BDCA-4: Three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood.
Journal of Immunology **165** 6037-46
- [32] Dzionek, A., Iganaki, Y., Okawa, K., Nagafune, J., Sohma, Y., Winkels, G., Zysk, M., Yamaguchi, Y., Schmitz, J. (2002) Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions.
Hum Immunol **63** 1133-48
- [33] Dzionek, A., Sohma, Y., Nagafune, J., Cella, M., Colonna, M., Facchetti, F., Günther, G., Johnston, I., Lanzavecchia, A., Nagasaka, T., Okada, T., Vermi, W., Winkels, G., Yamamoto, T., Zysk, M., Yamaguchi, Y., Schmitz, J. (2001) BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon α/β induction.
Journal of Experimental Medicine **194** 1823-34
- [34] Engering, A., Geijtenbeek, T.B., van Vliet, S.J., Wijers, M., vanLiempt, E., Demarex, N., Lanzavecchia, A., Fransen, J., Figdor, C.G., Piguët, V., vanKooyk, Y. (2002) The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T-cells.
Journal of Immunology **168** 2118-26
- [35] Fairchild, Waldman, Gardner. (Zugriff Mai 2005) Project Number 131 - Method for producing dendritic cells.
www.isis-innovation.com/licensing/131.htm
- [36] Ferlazzo, G., Klein, J., Paliard, X., Wei, W.Z., Galy, A. (2000) Dendritic cells generated from CD34⁺ progenitor cells with flt3 ligand, c-kit ligand, GM-CSF, IL-4 and TNF- α are functional antigen-presenting cells resembling mature monocyte-derived dendritic cells.
Journal of Immunotherapy **23** 48-58
- [37] Flores-Romo, L., Björck, P., Duvert, V., vanKooten, C., Saeland, S., Bancherau, J. (1997) DC40 ligation on human cord blood CD34⁺ hematopoietic progenitors induces their proliferation into functional dendritic cells.
Journal of Experimental Medicine **185** 341-9

- [38] Galibert, L., Maliszewski, C.R., Vandenabeele, S. (2001) Plasmacytoid monocytes/T-cells: a dendritic cell lineage? *Seminars in Immunology* **13** 183-9
- [39] Gluckman, J.C., Canque, B., Rosenzweig, M. (2002) Dendritic cells: A complex simplicity. *Transplantation* **73** 3-6
- [40] Grabbe, S., Kämpgen, E., Schuler, G. (2000) Dendritic cells: Multi-lineal and multi-functional. *Immunology today* **21** 431-3
- [41] Gratama, J.W., Sutherland, D.R., Keeney, M., Papa, S. (2001) Flow cytometric enumeration and immunophenotyping of hematopoietic stem and progenitor cells. *J Biol Regul Homeost Agents* **15** 14-22
- [42] Gu, C., Limberg, B.J., Whitaker, B., Perman, B., Leahy, D.J., Rosenbaum, J.S., Ginty, D.D., Kolodkin, A. (2002) Characterization of Neuropilin-1 Structural Features that Confer Binding to Semaphorin 3A and Vascular Endothelial Growth Factor 165. *J Biol Chem* **277** 18069-76
- [43] Gunzer, M., Grabbe, S. (2001) Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Critical Reviews in Immunology* **21** 133-45
- [44] Gunzer, M., Jänich, S., Varga, G., Grabbe, S. (2001) Dendritic cells and tumor immunity. *Seminars in Immunology* **13** 291-302
- [45] Gunzer, M., Schäfer, A., Borgmann, S., Zänker, K.S., Brücker, E.B., Kämpgen, E., Friedl, P. (2000) Antigen presentation in extracellular matrix: Interactions of T-cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity* **13** 323-32
- [46] Hart, D. (1997) Dendritic cells: Unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood*, **90** 3245-3287
- [47] Howard, C.J., Sopp, P., Brownlie, J., Kwong, L.S., Parsons, K.R., Taylor, G. (1997) Identification of two distinct populations of dendritic cells in afferent lymph that vary in their ability to stimulate T cells. *J Immunol* **159** 5372-82

- [48] Inaba, K., Turley, S., Iyoda, T., Yamaide, F., Shimoyama, S., Reis e Sousa, C., Gemain, R.M., Mellman, I., Steinman, R.M. (2000) The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *Journal of Experimental Medicine* **191** 927-36
- [49] Janeway, C.A. Jr., Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology* **20** 197-216
- [50] Janeway, C.A., Travers, P. (1997) *Immunologie*. Spektrum Verlag
- [51] Kämpgen, E., Koch, F., Heufler, C., Eggert, A., Gill, L.L., Gillis, S., Dower, S.K., Romani, N., Schuler, G. (1994) Understanding the dendritic cell lineage through a study of cytokine receptors. *Journal of Experimental Medicine* **179**, 1767-76
- [52] Klein, J. (1991) *Interferon aus der immunologischen Perspektive*. Immunologie VHC-Verlag
- [53] Kobari, L., Giarratana, M.C., Pflumio, F., Izac, B., Coulombel, L., Douay, L. (2001) CD133⁺ cell selection is an alternative to CD34⁺ cell selection for ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research* **10** 273-81
- [54] Kögler, G., Callejas, J., Hakenberg, P., Enczmann, J., Adams, O., Däubener, W., Krempe, C., Göbel, U., Somville, T., Wernet, P. (1996) Hematopoietic transplant potential of unrelated cord blood: Critical issues. *Journal of Hematotherapy* **5** 105-16
- [55] Kooten, C. van, Banchereau, J. (1997) Functional role of CD40 and its ligand. *International Archives of Allergy and Immunology* **113** 393-9
- [56] Krause, D.S., Fackler, M.J., Civin, C.I., May, W.S. (1996) CD34: Structure, biology, and clinical utility. *Blood* **87** 1-13
- [57] Krug, A., Towarowski, A., Britsch, S., Rothenfusser, A., Hornung, V., Bals, R., Giese, T., Engelmann, H., Endres, S., Krieg, A.M., Hartmann, G. (2001) Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur.J.Immunol.* **31** 3026-37

- [58] Lambrecht, B.N. (2001) Allergen uptake and presentation by dendritic cells. *Current Opinion on Allergy and Clinical Immunology* **1** 51-9
- [59] Lanza, F., Healy, L., Sutherland, D.R. (2001) Structural and functional features of the CD34 antigen: an update. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agent* **2**
- [60] Lardon, F., Snoeck, H.W., Berneman, Z.N., vanTendeloo, V.F.I., Nijs, G., Lenjou, M., Henckaerts, E., Boeckxtaens, C.J., Vandenabeele, P., Kestens, L.L., vanBockstaele, D.R. (1997) Generation of dendritic cells from bone marrow progenitors using GM-CSF, TNF- α , and additional cytokines: antagonistic effects of IL-4 and IFN- γ and selective involvement of TNF- α receptor-1. *Immunology* **91** 553-9
- [61] Lipscomb, M.F., Masten, B.J. (2002) Dendritic Cells: Immune Regulators in Health and Disease. *Physiology Review* **82** 97-130
- [62] Liu, E., Tu, W., Law, H., Lau, Y.L. (2001) Changes of CD14 and CD1a Expression in Response to IL-4 and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Are Different in Cord Blood and Adult Blood Monocytes. *Pediatric Research* **50**, 184-189
- [63] Liu, Y.J., Kanzler, H., Soumelis, V., Gilliet, M. (2001) Dendritic cells lineage, plasticity and cross regulation. *Nature Immunology* **2** 585-9
- [64] Liu, Y.J., Risoan, M.C., Briere, F., de Waal Malefyt, R., Kadowaki, N. (1999) Two dendritic cell subsets DC1 and DC2 induce TH1 versus TH2 differentiation in humans. 38th midwinter conference of immunologists 1999
- [65] Mahnke, K., Schmitt, E., Bonifaz, L., Enk, A.H., Jonuleit, H. (2002) Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Imm&Cell Biol* **80**
- [66] Manz, M.G., Traver, D., Akashi, K., Merad, M., Miyamoto, T., Engleman, E.G., Weissman, I.L. (2001) Dendritic cell development from common myeloid progenitors. *Annals of the New York Academy of Science* **938** 167-73
- [67] Manz, M.G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I.L., Akashi, K. (2001) Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* **97** 3333-41

- [68] Martin, P., Del Hoyo, G.M., Anjuere, F., Ruiz, S.R., Arias, C.F., Marin, A.R., Ardavin, C. (2000) Concept of lymphoid versus myeloid dendritic cell lineages revisited: Both CD8alpha⁽⁻⁾ and CD8alpha⁽⁺⁾ dendritic cells are generated from CD4(low) lymphoid-committed precursors.
Blood **96** 2511-19
- [69] McLellan, I., Kämpgen, E. (2000) Functions of myeloid and lymphoid dendritic cells.
Immunology Letters **72** 101-5
- [70] Middleton, E. (1998) Allergy: Principles and Practice.
Mosby-YearBook, Inc., 5th ed.
- [71] Nakamura, K., Saitoh, A., Yasaka, N., Furue, M., Tamaki, K. (1999) Molecular mechanisms involved in the migration of epidermal dendritic cells in the skin.
Journal of Investigative Dermatology **4** 169-72
- [72] Navarrete, C.V., Gomez, J., Borrás, F.E. (2003) Cord Blood Dendritic Cells: Subsets, Functional Characteristics and In Vitro Generation.
Leukemia&Lymphoma **44** 923-28
- [73] Nencioni, A., Brossart, P., (2001) New perspectives in dendritic cell-based cancer immunotherapy.
BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceutica and Gene Therapy **15** 667-79
- [74] Nestle, F.O. (2000) Dendritic cell vaccination for cancer therapy.
Oncogene **19** 6673-9
- [75] Nimgaonkar, M.T., Roscoe, R.A., Persichetti, J., Rybka, W.B., Winkelstein, A., Ball, E.D. (1995) A unique population of CD34⁺ cells in cord blood.
Stem Cells **13** 158-66
- [76] Olweus, J., BitMansour, A., Warnke, R., Thompson, P.A., Carballido, J., Picker, L., Lund-Johansen, F. (1997) Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin.
Immunology **94** 12551-6
- [77] Pan, P.Y., Rothman, P. (1999) IL-4 receptor mutations.
Current Opinion in Immunology **11** 615-20

- [78] Pasino, M., Lanza, T., Marotta, F., Scarso, L., deBiasio, P., Amato, S., Corcione, A., Pistoia, V., Mori, P.G. (2000) Flow cytometric and functional characterization of AC133⁺ cells from human umbilical cord blood. *British Journal of Haematology* **108** 793-800
- [79] Peiser, L., Mukhopadhyay, S., Gordon, S. (2002) Scavenger receptors in innate immunity. *Current Opinion in Immunology* **14** 123-8
- [80] Penna, G., Sozzani, S., Adorini, L. (2001) Selective usage of chemokine Receptors by plasmacytoid dendritic cells. *J.Immunol.* **167** 1862-66
- [81] Pichler, W.J. (1997) Regulation der Immunantwort: Das TH1/TH2-Konzept. *Schweizer medizinische Wochenschrift* **127** 341-48
- [82] Piechaczek, C. (2001) CD133. *Journal of Biological regulators and Homeostatic Agents* **15** 101-2
- [83] Rabian-Herzog, C., Lesage, S., Gluckman, E., et al. (1993) Characterization of lymphocyte subpopulations in cord blood. *Journal of Hematotherapy* **2** 255-7
- [84] Reddy, V., Iturraspe, J.A., Tzolas, A.C., Meier-Kriesche, H.U., Schold, J., Wingard, J.R. (2004) Low dendritic cell count after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts relapse, death, and acute graft-versus-host disease. *Blood* **103** 4330-5
- [85] Rönnblom, L., Alm, G.V. (2001) A Pivotal Role for the Natural Interferon- α -producing cells (plasmacytoid dendritic cells) in the pathogenesis of Lupus. *J.Exp.Med* **194** 59-63
- [86] Roskrow, M.A., Zibert, A., Souquet, M., Dilloo, D. (1999) Tumor vaccines - application to childhood cancer. *Klinische Pädiatrie* **211** 336-46
- [87] Santambrogio, L., Sato, A.K., Carven, G.J., Belyanskaya, S.L., Strominger, J.L., Stern, L.J. (1999) Extracellular antigen processing and presentation by immature dendritic cells. *PNAS* **96** 15056-61
- [88] Saraya, K., Reid, C.D. (1996) Stem cell factor and the regulation of dendritic cell production from CD34⁺ progenitors in bone marrow and cord blood. *British Journal of Haematology* **93** 258-64

- [89] Satthaporn, S., Eremin, O. (2001) Dendritic cells (I): Biological functions. *Journal of the Royal College of Surgeons of Edinburgh* **46** 9-19
- [90] Schibler, K.R., Georgelas, A., Rigaa, A. (2002) Developmental biology of the dendritic cells system. *Acta Paediatrica* **91** 9-16
- [91] Servida, F., Soligo, D., Caneva, L., Bertolini, F., deHarven, E., Campiglio, S., Corsini, C., Deliliers, G.L. (1996) Functional and morphological characterization of immunomagnetically selected CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells* **14** 430-8
- [92] Shortman, K, Caux, C. (1997) Dendritic cell development: multiple pathways to nature's adjuvants. *Stem Cells* **15** 409-19
- [93] Smith, M.A., Pallister, C.J. and Smith, J.G. (2001) Stem cell factor: Biology and relevance to clinical practice. *Acta Haematologica* **105** 143-50
- [94] Soilleux, E.J., Morris, L.S., Leslie, G., Chemimi, J., Lou, Q., Levroney, E., Trowsdale, J., Montaner, L.J., Doms, R.W., Weissman, D., Coleman, N., Lee, B. (2002) Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *Journal of Leukocyte Biology* **71** 445-57
- [95] Somersan, S., Larson, M., Fonteneau, J.F., Basu, S., Srivastava, P., Bhardwaj, N. (2001) Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells. *Journal of Immunology* **167** 4844-52
- [96] Sorg, R.V., Kögler, G., Wernet, P. (1999) Identification of cord blood dendritic cells as an immature CD11c-population. *Blood* **93** 2302-7
- [97] Sozzani, S., Allavena, P., Annunziata, V., Mantovani, A. (2000) Chemokines and dendritic cell traffic. *Journal of Clinical Immunology* **20** 151-60
- [98] Steinman, R.M. (Zugriff Dezember 2005) Introduction to dendritic cells. <http://www.rockefeller.edu/labheads/steinman/steinman-lab.php>

- [99] Steinman, R.M., Cohn, Z.A. (1973) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution.
Journal of Experimental Medicine **139** 380-97
- [100] Steinman, R.M., Inaba, K. (1999) Myeloid dendritic cells.
Journal of Leukocyte Biology **66** 205-8
- [101] Steinman, R.M., Pack, M., Inaba, K. (1997) Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs.
Immunol Rev **156** 25-37
- [102] Steinman, R.M., Pope, M. (2002) Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy.
J Clin Invest **109** 1519-26
- [103] Stockwin, L.H., McGonagle, D., Martin, I.G., Blair, G.E. (2000) Dendritic cells: immunological sentinels with a central role in health and disease.
Immunology and Cell Biology **78** 91-102
- [104] Strobl, H., Platzner, B., Taschner, A., Jörgl, A., Scholz, W., Höcher, B., Hennebelle, M., Keller, T., Todoric, J. (Zugriff Januar 2004) Hematopoietic stem cells and dendritic cell biology.
<http://www.meduniwien.ac.at/immunologie/content/research/strobl.htm>
- [105] Strobl, H., Riedl, E., Bello-Fernandez, C., Knapp, W. (1997/98) Epidermal langerhans cell development and differentiation.
Immunobiology **198** 588-605
- [106] Szabolcs, P., Moore, M.A.S., Young, J.W. (1995) Expansion of immunostimulatory dendritic cells among the myeloid progeny of human CD34⁺ bone marrow precursors cultured with *c-kit* ligand, GM-CSF, and TNF- α .
Journal of Immunology **154** 5851-61
- [107] Théry, C., Amigorena, S. (2001) The cell biology of antigen presentation in dendritic cells.
Current Opinion in Immunology **13** 45-51
- [108] Vandenabeele, S., Wu, L. (1997) Dendritic cell origins: Puzzles and paradoxes.
Immunology and Cell Biology **77** 411-19

- [109] Wollenberg, A., Kraft, S., Hanau, D., Bieber, T. (1996) Immunomorphological and ultrastructural characterization of langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema.
Journal of Investigative Dermatology **106** 446-53
- [110] Wollenberg, A., Wagner, M., Gunther, S., Towarowski, A., Tuma, E., Moderer, M., Rothenfusser, S., Wetzel, S., Endres, S., Hartmann, G. (2002) Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases.
J Invest Dermatol **119** 1096-102
- [111] Wu, L., D'Amico, A., Hochrein, H., O'Keeffe, M., Shortman, K., Lucas, K. (2001) Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors.
Blood **98** 3376-82
- [112] Wu, L., Vandenabeele, S., Georgopoulos, K. (2001) Derivation of dendritic cells from myeloid and lymphoid precursors.
International Review of Immunology **20** 117-35
- [113] Wynter, E.A. de, Coutinho, L.H., Pei, X., Marsh, J.C., Hows, J., Luft, T., Testa, N.G. (1995) Comparison of purity and enrichment of CD34⁺ cells from bone marrow, umbilical cord and peripheral blood (primed for apheresis) using five separation systems.
Stem Cells **13** 524-32
- [114] Yin, A.H., Miraglia, S., Zanjani, E.D., Almeida-Poranda, G., Ogawa, M., Leary A.G., Olweus, J., Kearney, J., Buck, D.W. (1997) AC133⁺, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells.
Blood **90** 5002-5012
- [115] Yonezawa, A., Morita, R., Takaori-Kondo, A., Kadowaki, N., Kitawaki, T., Hori, T., Uchiyama, T. (2003) Natural alpha interferon producing cells respond to human immunodeficiency virus type 1 with alpha interferon production and maturation into denritic cells.
Journl of Virology 3777-84
- [116] Young, J.W. (1999) Dendritic Cells: Expansion and differentiation with hematopoietic growth factors.
Current Opinion on Hematology **6** 135-44
- [117] Young, J.W., Steinman, R.M. (1996) The hematopoietic development of dendritic cells: a distinct pathway for myeloid differentiation.
Stem Cells **14** 376-87

- [118] Zhang Y, Mukaida N, Harada A, Akiyama M, Matsushima K (1997)
Induction of dendritic cell differentiation by GM-CSF, SCF, and TNF- α in vitro
from lineage phenotype-negative c-kit⁺ murine hematopoietic progenitor Cells.
Blood **90** 4842-53

- [119] Zingg JM, Ricciarelli R, Azzi A (2000) Scavenger receptors and modified
lipoproteins: Fatal attractions?
IUBMB life **49** 397-403

- [120] Macrophage Scavenger Receptor (Zugriff Dezember 2005).
Gordon HomePage; <http://dunn1.path.ox.ac.uk/~cholt/sgMSR.html>

- [121] Commitment of stem cells to hematopoietic lineages: a functional genome
analysis (Zugriff Oktober 2004).
www.uni-duesseldorf.de/MedFak/lymphocytes/dezign/scope.php

- [122] Microbiology Lecture Guide (Zugriff September 2004).
<http://www.cat.cc.md.us/courses/bio141/lecguide/unit3/intro/th1th2.html>

- [123] Update on atopic dermatitis (Zugriff Januar 2005)
<http://www.medscape.com/viewarticle/420570>

Danksagung

- Ich danke zuerst und ganz besonders meinem Doktorvater, Herrn **Prof. Dr.med.UweSchauer**, für seine geduldige und hilfsbereite Art, immer die Zeit für ein konstruktives Gespräch zu finden und sein Wissen zu teilen. Es war mir eine Ehre, bei ihm diese Arbeit durchführen zu dürfen.
- Des weiteren danke ich Herrn **Dr.med.HolgerBartz**, der mir ganz wesentlich die Methoden- und Auswertungsplanung zu erstellen half, Frau **Dr.med.FriederikeBüning-Pfaue** für die erste Einarbeitung im Labor und natürlich den MTA's des immunologischen Labors, **Frau Angelika Michel** und **Frau VeronikaBaumeister**, für die Zeit und Geduld, die sie ihren Doktoranden widmen.
Dank gilt hier auch **HerrnDipl.Biol.StefanHöxtermann**, der das schier unlösbare Rätsel der Konversion von FACS-Bildern zu Word-Dokumenten mit ein paar Mausklicks beseitigte.
- Nicht zuletzt haben auch mein Mann, **HerrDr.med.RolandLukas**, sowie mein Bruder, **HerrVolkmar Frinken**, für ihre Hilfsbereitschaft in informationstechnischen Angelegenheiten und das Korrekturlesen ein großes „Dankeschön“ verdient.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Anne-Lie Lukas, geb. Frinken
Geburtstag und -ort	04. März 1977, in Bochum

Schul Ausbildung

1983-87	Gemeinschaftsgrundschule Wetter-Wengern
1987-96	Klassen 5 bis 13 am Ruhr-Gymnasium Witten, Abitur 05/1996
1993-94	Gastschuljahr an der Murray High School, Utah / USA

Hochschulausbildung

10/1996 –04/2004	Studium der Humanmedizin an der Ruhr-Universität Bochum; Drittes Staatsexamen 04/2004
------------------	--

Beruf

07/2004-12/2005	Facharztweiterbildung Dermatologie an der Universitäts- klinik der Christian-Albrechts-Universität Kiel
02/2006-bis jetzt	Facharztweiterbildung Dermatologie in der Tagesklinik und Gemeinschaftspraxis Dres. H. Brüning/ H. Weiß in Kiel