

Aus der Kinderklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Christoph Härtel

**CD14-Reexpression definiert einen immunregulatorischen Phänotyp
Monozyten-gereifter Zellen nach IL-10/R848-Stimulation**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Sören Krakow

aus Düsseldorf

Würzburg, Juli 2020



Referent: Prof. Dr. med. Matthias Wölfel

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Manfred Lutz

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 02.02.2021

Der Promovend ist Arzt

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	
Tabellenverzeichnis	
Abkürzungsverzeichnis	
1 Einleitung	1
1.1 Das humane Immunsystem.....	1
1.1.1 Angeborenes Immunsystem	1
1.1.2 Adaptives Immunsystem.....	1
1.2 Das mononukleäre-phagozytäre System: <i>in vivo</i>	2
1.2.1 Dendritische Zellen – zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem	2
1.2.2 Makrophagen.....	5
1.2.3 Slan ⁺ Zellen.....	6
1.3 Monozyten-gereifte dendritische Zellen: <i>in vitro</i>.....	6
1.4 Interleukin 10: Vermittler der Immuntoleranz	7
1.4.1 Tolerogene dendritische Zellen	7
1.4.2 Interleukin 10 (IL-10).....	8
1.5 Dendritische Zelle als Tumorstoffimpfung	11
1.6 Zielsetzung der Arbeit	12
2 Material.....	14
2.1 Geräte	14
2.2 Verbrauchsmaterialien	14
2.3 Lösungen, Medien und Puffer	15
2.4 Wachstumsfaktoren und Stimuli	15
2.5 Antikörper	16
2.6 Kits	16
2.7 Software	17
2.8 Firmenverzeichnis.....	17
3 Methoden.....	19
3.1 Ethikvotum	19
3.2 Isolation von PBMCs durch Dichtegradientenzentrifugation	19
3.3 Zellkultur	20
3.3.1 Generierung von Monozyten-gereiften dendritischen Zellen	20
3.3.2 Reifung dendritischer Zellen	21

3.4	Zelldepletion und -elution.....	22
3.4.1	LD-Säulen	22
3.4.2	MS-Säulen	23
3.5	Durchflusszytometrie.....	23
3.5.1	Prinzip	23
3.5.2	Kompensation	24
3.5.3	Oberflächenantigen-Färbung.....	25
3.6	Funktionelle Methoden	25
3.6.1	Dextran-Assay: Makropinozytose	25
3.6.2	ELISA	26
3.7	Statistik	28
4	Ergebnisse	29
4.1	Unreife dendritische Zellen verlieren ihren Monozytenmarker CD14	29
4.2	CD14-Reexpression	31
4.2.1	CD14-Reexpression wird durch IL-10 und R848 stimuliert	31
4.2.2	CD14-Reexpression wird durch IL-10 und R848 bei CD14-depletierten Zellen stimuliert.....	32
4.2.3	R848 allein steigert die CD14-Reexpression leicht	33
4.2.4	IL-10 in Kombination mit R848 steigert die CD14-Reexpression stark	34
4.2.5	TNF- α reduziert die CD14-Reexpression.....	35
4.2.6	PGE ₂ verstärkt die CD14-Reexpression	36
4.2.7	IL-4 und GM-CSF haben keinen Einfluss auf die CD14-Reexpression.....	37
4.2.8	Eine siebentägige Inkubationsdauer hat keinen zusätzlichen Einfluss auf die CD14-Reexpression	38
4.3	Zwei Zellpopulationen: CD14⁺- und CD83⁺-Population.....	40
4.3.1	IL-10 reduziert nicht die Expression kostimulierender Oberflächenmarker auf CD83 ⁺ mDCs	41
4.3.2	IL-10 fördert eine immunmodulatorische CD14 ⁺ Population: M2c-like Makrophagen.....	44
4.3.3	TNF- α - oder PGE ₂ -Präinkubation beeinflussen nicht die Differenzierung von CD83 ⁺ mDCs durch exogenes IL-10	46
4.3.4	TNF- α - oder PGE ₂ -Präinkubation beeinflussen nicht die Differenzierung von CD14 ⁺ M2c-like Makrophagen durch exogenes IL-10	49
4.4	M2c-Makrophagen zeigen einen stabilen Phänotyp.....	51

4.4.1	IL-4 und GM-CSF in höherer Konzentration haben keinen Einfluss auf den M2c-like Makrophagen Phänotyp	51
4.4.2	Siebtägige Inkubationsdauer hat keinen Einfluss auf den M2c-like Makrophagen Phänotyp	53
4.5	M2c-like Makrophagen: gesteigerte Makropinozytose.....	56
4.6	Zytokinsekretion.....	58
4.6.1	IL-6-Sekretion wird durch IL-10 inhibiert	58
4.6.2	CCL17-Sekretion wird durch IL-10 nicht beeinflusst	60
4.7	Slan⁺ Zellen: Betrachtung einer <i>in vivo</i> relevanten Population.....	61
5	Diskussion	64
5.1	CD14-Reexpression definiert alternative Zellaktivierung.....	64
5.2	IL-10 bewirkt quantitative Veränderungen bei Monozyten-gereiften Zellen.....	68
5.3	CD14 ⁺ M2c-like Makrophagen zeigen einen stabilen immunmodulatorischen Phänotyp	71
5.4	Therapeutische Anwendung	72
5.5	Methodendiskussion	73
5.6	Zusammenfassung	75
6	Literaturverzeichnis	77
7	Glossar	87
	Danksagung.....	
	Veröffentlichungen	
	Lebenslauf	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hämatopoese der dendritischen Zellen (nach ³ modifiziert).....	4
Abbildung 2: Dichtegradientenzentrifugation.....	20
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Zellkulturen	22
Abbildung 4: Gating von Zellpopulationen	24
Abbildung 5: Das Prinzip des Sandwich-ELISAs	28
Abbildung 6: Monozyten verlieren während ihrer Entwicklung zu iDCs den Marker CD14	30
Abbildung 7: Unreife dendritische Zellen exprimieren weniger CD14 als Monozyten .	30
Abbildung 8: Expression von CD83 und CD14 unter IL-10 und/oder R848-Stimulation	32
Abbildung 9: Reexpression von CD14 nach IL-10 und R848-Stimulation nach CD14- Depletion	32
Abbildung 10: CD14-Reexpression nach 24-stündiger Stimulation.....	33
Abbildung 11: Titration mit dem TLR-Agonisten R848	34
Abbildung 12: Titration mit IL-10	35
Abbildung 13: Titration mit TNF- α	36
Abbildung 14: Titration mit PGE ₂	37
Abbildung 15: Hohe Konzentration von IL-4 oder GM-CSF haben keinen Einfluss auf die CD14-Expression bei IL-10-Inkubation.....	38
Abbildung 16: 7-Tages-Kultur	39
Abbildung 17: Gates von CD14 ⁺ und CD83 ⁺ Population	40
Abbildung 18: Antigenexpression von B7- und B2-Molekülen	43
Abbildung 19: Antigenexpression von Makrophagenmarkern	45
Abbildung 20: Antigenexpression von B7- und B2-Molekülen bei TNF- α - oder PGE ₂ - Präinkubation	48
Abbildung 21: Antigenexpression von Makrophagenmarkern bei TNF- α - oder PGE ₂ - Präinkubation	50
Abbildung 22: Antigenexpression ausgewählter Marker bei zehnfacher Konzentration von IL-4 und GM-CSF bei R848- und IL-10-stimulierten Zellen	52
Abbildung 23: Antigenexpression von B7- und B2-Molekülen auf den Subpopulationen CD14 ⁺ und CD83 ⁺ bei siebentägiger Kultur	54
Abbildung 24: Antigenexpression von Makrophagenmarkern auf den Subpopulationen CD14 ⁺ und CD83 ⁺ bei siebentägiger Kultur	55

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 25: Dextran-Aufnahme der CD14 ⁺ und CD83 ⁺ Population bei unterschiedlichen Inkubationszeiten	56
Abbildung 26: Dextran-Aufnahme bei unterschiedlicher Stimulation nach 90 min.....	57
Abbildung 27: IL-6-Sekretion bei R848- und/oder IL-10-inkubierten Zellen.....	59
Abbildung 28: IL-6-Sekretion bei R848-Stimulation und IL-10-Titration.....	59
Abbildung 29: IL-6-Sekretion bei zusätzlicher TNF- α -Präinkubation.....	60
Abbildung 30: CCL17-Sekretion bei R848- und IL-10-stimulierten Zellen.....	60
Abbildung 31: Differenzierung von slan ⁺ Zellen nach R848- und/oder IL-10-Inkubation	62
Abbildung 32: CD14- und CD83-Expression von slan ⁺ Zellen.....	62
Abbildung 33: Antigenexpression ausgewählter Marker bei slan ⁺ Zellen.....	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	14
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	14
Tabelle 3: Lösungen, Medien und Puffer.....	15
Tabelle 4: Wachstumsfaktoren und Stimuli	15
Tabelle 5: Antikörper	16
Tabelle 6: Kits	16
Tabelle 7: Software	17
Tabelle 8: Firmenverzeichnis	18

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	analysis of variance
APC (Fluorochrom)	allophycocyanin
APC	antigen presenting cell
CCL17/18/19/21	C-C chemokine ligand 17/18/19/21
CCR7	C-C chemokine receptor type 7
CD	cluster of differentiation
cDC	conventional dendritic cell
CDP	common dendritic cell progenitor
CLR	C-type lectin receptor
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CXCR4	CXC chemokine receptor type 4
CX3CR1	CX3C chemokine receptor 1
DC	dendritic cell
DC-SIGN	dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin
DMSO	dimethyl sulfoxide
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FITC	fluorescein isothiocyanate
FOXP3	forkhead-box-protein P3
FSC	forward scatter
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GvHD	graft-versus-host-disease
HLA-DR	human leukocyte antigen - DR isotype
HRP	horseradish peroxidase
HS	human serum
HSC	hematopoetic stem cell
iDC	immature dendritic cell
IL	interleukin
INF- γ	interferon- γ
JAK	Janus kinase
LMPP	lymphoid primed multi-potent progenitor

Abkürzungsverzeichnis

LRP1	low-density lipoprotein receptor-related protein 1
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MD-2	myeloid differentiation factor 2
mDC	mature dendritic cell
MDSC	myeloid-derived suppressor cell
MFI	mean fluorescence intensity
MHC	major histocompatibility complex
MIP-3 β	macrophage inflammatory protein-3- β
MLR	mixed lymphocyte reaction
MMR	macrophage mannose receptor
mo-DC	monocyte-derived dendritic cell
mo-mac	monocyte-derived macrophage
mTOR	mechanistic target of rapamycin
NLR	nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor
ns	not significant
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffered saline
pDC	plasmacytoid dendritic cell
PD-1	programmed cell death protein 1
PD-L1/2	programmed cell death 1 ligand 1/2
PE	phycoerythrin
PerCpCy5.5	peridinin-chlorophyll protein cyanine 5.5
PGE ₂	prostaglandin E2
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
poly I:C	polyinosinic:polycytidylic acid
PRR	pattern recognition receptor
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
rpm	revolutions per minute
SD	standard deviation
SLC	secondary lymphoid-tissue chemokine
SCRC	scavenger receptor cysteine-rich
SSC	side scatter
STAT	signal transducers and activators of transcription

Abkürzungsverzeichnis

TAM	tumor associated macrophages
TARC	thymus and activation-regulated chemokine
T _{H1/2/17}	type 1/2/17 T helper cell
TLR	toll-like receptor
TMB	tetramethylbenzidine
TNF- α	tumor necrosis factor α
tolDC	tolerogenic dendritic cell
T _{reg}	regulatory T cell
U	unit

1 Einleitung

1.1 Das humane Immunsystem

Der menschliche Körper ist zeitlebens mit diversen schädlichen Einflüssen konfrontiert. Um sich davor zu schützen hat sich das Immunsystem entwickelt, das vor Noxen und Pathogenen schützt. Neben einer anatomischen Barriere, sowie chemischen und enzymatischen Schutzmechanismen, lässt sich das Immunsystem in ein angeborenes und in ein adaptives Immunsystem unterteilen.

1.1.1 Angeborenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem reagiert typischerweise relativ schnell im Vergleich zum Erworbenen auf Pathogene wie Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten. Makrophagen, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen sind unter anderem an der angeborenen Abwehr beteiligt. Um zwischen fremden und eigenen Einflüssen zu unterscheiden, tragen diese Zellen sog. *pattern recognition receptors* (PRRs), die die pathogenen Strukturen, auch *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) genannt, erkennen. Die Rezeptoren können sowohl transmembranär, wie die *Toll-like* Rezeptoren (TLRs), als auch zytoplasmatisch, wie die *NOD-like* Rezeptoren (NLRs), vorkommen. Ihre Aktivierung regt die Zellen entweder selbst an, z.B. zur Phagozytose, oder bedingt eine Kaskade weiterer Immunzellen, die über Zytokine und Chemokine vermittelt wird.

1.1.2 Adaptives Immunsystem

Das adaptive Immunsystem trägt zu einer effektiveren Antwort auf Pathogene bei, als es dem angeborenen Immunsystem möglich ist.

Verantwortlich sind vor allem zwei Gruppen von Lymphozyten – die B-Zellen und die T-Zellen. Über antigen-spezifische Rezeptoren können Pathogene deutlich spezifischer erkannt und bekämpft werden. Während B-Zellen immunogene Oberflächenstrukturen erkennen können, benötigen T-Zellen, um körperfremde Antigene zu erkennen, eine antigenpräsentierende Zelle (APC), die das Antigen intrazellulär prozessiert und über *major histocompatibility complex* (MHC)-Moleküle präsentiert. Diese Zellen sind unter anderem die dendritischen Zellen (DCs).

Das Besondere des adaptiven Immunsystems ist auch das immunologische Gedächtnis: während beispielsweise ein Makrophage (angeborenes Immunsystem) zwar sofort auf Pathogene reagieren kann, ändert sich die Reaktion im Lauf der Zeit nicht. Antigen-erfahrene T- und B-Zellen (Gedächtniszellen) zeigen dagegen eine wesentlich schnellere und robustere Antwort inklusive einer erhöhten Proliferation bei Zweitexposition gegenüber einem Antigen.

Da die adaptive Immunantwort, insbesondere beim Erstkontakt, erst später einsetzt als die angeborene Abwehr, sind beide sehr wichtig.

1.2 Das mononukleäre-phagozytäre System: *in vivo*

Zellen reagieren auf extra- oder intrazelluläre Stimuli und werden somit zur Reifung und Differenzierung zu unterschiedlichen Zelltypen, die sich in Funktionalität und Phänotyp unterscheiden, angeregt. Die extrazellulären Stimuli werden über Rezeptoren vermittelt, die sowohl in der Zellmembran verankert sind als auch im Zytosol von Zellen vorhanden sind. Die membranständigen Rezeptoren besitzen neben extrazellulären auch intrazelluläre Domänen, die die Signalkaskaden auslösen und das Signal bis auf die Ebene von Zellkernen und folglich Transkription und Translation weitergeben. Abhängig von der Kombination und der Reihenfolge der Stimuli, sowie dem Zeitpunkt der Stimulation bezüglich des Differenzierungsgrads der Zelle, können aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle heterogene Zellpopulationen entstehen. In dieser Arbeit wurde die Differenzierung unter diversen Stimuli zu verschiedenen Zelltypen untersucht, auf die im Folgendem näher eingegangen wird.

1.2.1 Dendritische Zellen – zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem

Dendritische Zellen spielen eine bedeutende Rolle in der Immunantwort und stellen das Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem dar. Sie wurden erstmalig 1973 in Lymphorganen von Mäusen entdeckt und beschrieben^{1,2}. Sie gehören neben Monozyten und Makrophagen zu den mononukleären Phagozyten und gehören zur Gruppe der antigenpräsentierenden Zellen (wie auch Monozyten, Makrophagen und B-Zellen)³.

Einleitung

Dendritische Zellen kann man wiederum in zwei verschiedene Hauptgruppen unterteilen. Man unterscheidet die myeloiden bzw. konventionellen dendritischen Zellen, die sich wiederum in zwei Populationen aufteilen (cDC1 und cDC2), von den plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC)⁴.

Ursprünglich ging man hämatopoetisch von einer getrennt lymphoiden und myeloiden Entwicklung aus, während man heute von einer gemeinsamen lymphoiden, multipotenten Vorläuferzelle ausgeht³. Aus dieser Vorläuferzelle entstehen auch Monozyten, aus denen sich ebenfalls dendritische Zellen entwickeln können (Abbildung 1).

Die zuletzt genannte Gruppe stellen die sog. *monocyte-derived dendritic cells* (mo-DCs) dar, die auch *in vitro* generiert werden können.

Ausgereifte, differenzierte dendritische Zellen sind relativ selten im menschlichen Blut vorhanden und machen weniger als 1% der mononukleären Zellpopulation aus. Ihre Funktion besteht zum einen in der Produktion von Interferonen, wodurch sie für die angeborenen Immunantwort von Bedeutung sind, und zum anderen in der Aktivierung von T-Zellen, weshalb sie auch besonders für das adaptive Immunsystem wichtig sind. Für Letzteres sind vor allem die cDCs verantwortlich und verschiedene Signale notwendig. Die Aktivierung findet zum einen durch MHC-Moleküle, zum anderen durch kostimulierende B7-Moleküle, wie die Oberflächenantigene CD80 und CD86, und Zytokinen statt⁵. Des Weiteren sind dendritische Zellen die einzigen APCs, die in der Lage sind naive T-Zellen zu stimulieren, weshalb sie u.a. für den therapeutischen Nutzen so interessant sind^{2,6}.

Während der Reifung der dendritischen Zellen werden vermehrt MHC-Peptid-Moleküle, B7-Moleküle und Adhäsionsmoleküle wie das DC-SIGN (CD209) exprimiert, wohingegen die Fähigkeit zur Phagozytose und Makropinozytose verloren geht.

Die lokale Produktion von Zytokinen durch Gewebsmakrophagen als Antwort auf Entzündungen dient u.a. der Ausreifung von dendritischen Zellen. Man unterscheidet *in vitro* je nach Reifungszustand der Zelle zwischen unreifen (iDCs) und reifen dendritischen Zellen (mDCs). Die Expression des Oberflächenmarkers CD83 dient, wie auch in der vorliegenden Arbeit, als Erkennungsmerkmal einer mDC *in vitro*⁷.

Einleitung

Dendritische Zellen dienen neben ihrer Funktion als Vermittler von Immunität auch als Vermittler von Toleranz. Beispiele hierfür sind u.a. die B7-Moleküle CD273 (PD-L2) und CD274 (PD-L1). Beide Liganden sind wichtig zur Erhaltung von Selbsttoleranz. Die kostimulierenden Rezeptoren der dendritischen Zellen regen die T-Zellen unterschiedlich an und zeigen, dass damit verschiedene Funktionen im Körper je nach Stimulus und Differenzierungsgrad der Zelle wahrgenommen werden können.

In vitro kann man Monozyten mit IL-4 und GM-CSF stimulieren, sodass diese zu iDCs heranreifen⁸. Dauer et. al zeigt, dass iDCs bereits innerhalb von 48 h heranreifen und nach Stimulation weiter zu mDCs ausdifferenzieren⁹. Auch in dieser Arbeit wurde mit *in vitro* stimulierten Monozyten gearbeitet und ihre Differenzierung zu dendritischen Zellen analysiert. Diese teilen in vieler Hinsicht Eigenschaften von *in vivo* zirkulierenden myeloiden Zellen und sind u.a. in der Lage eine ausreichende T-Zell-Antwort zu stimulieren.

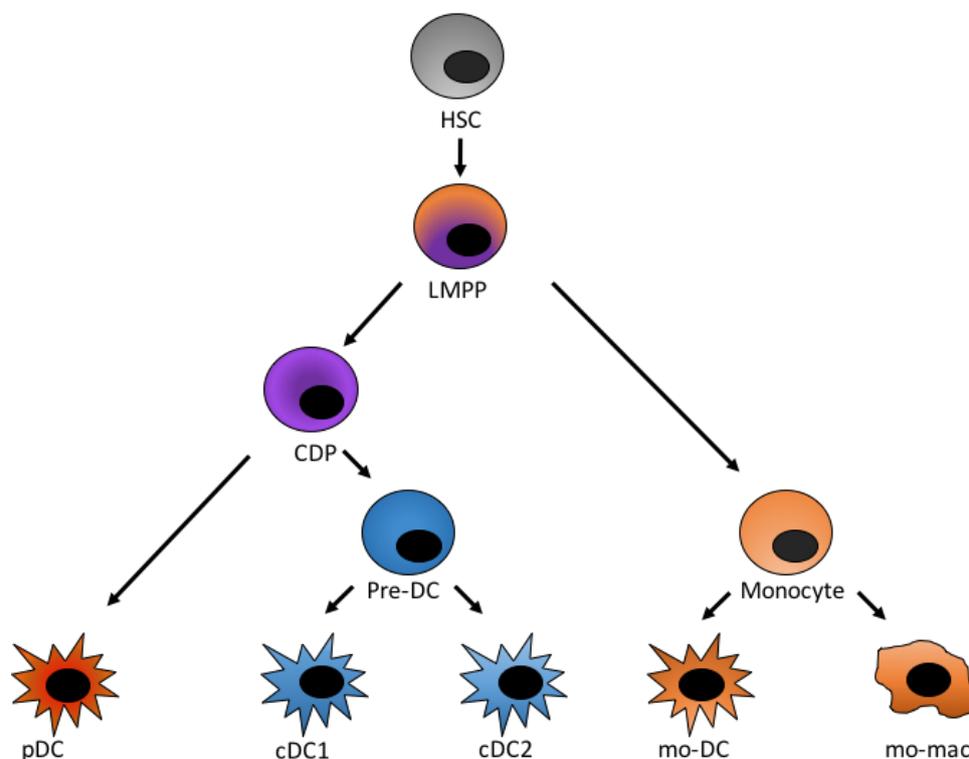


Abbildung 1: Hämatopoese der dendritischen Zellen (nach³ modifiziert)

Aus der hämatopoetischen Stammzelle (HSC) geht die lymphoide multipotente Vorläuferzelle (LMPP) hervor, aus der sich sowohl die dendritische Vorläufer-Zelle (CDP) als auch der Monozyt entwickelt.

1.2.2 Makrophagen

Makrophagen können sich wie die dendritischen Zellen u.a. von den Monozyten ableiten¹⁰. Während einer Inflammationsreaktion werden Monozyten u.a. durch Zytokine, Pathogene und Chemokine angelockt sowie stimuliert und differenzieren zu Makrophagen. Diese lassen sich je nach Differenzierung in verschiedene Populationen aufteilen und üben in Abhängigkeit des Mikromilieus pro- oder anti-inflammatorische Funktionen aus. Es werden vor allem die pro-inflammatorischen M1-Makrophagen von den anti-inflammatorischen M2-Makrophagen unterschieden. Erstere werden hauptsächlich klassisch durch die Zytokine INF- γ und TNF- α aktiviert und sind bei der Abwehr von intrazellulären Pathogenen von Bedeutung. M2-Makrophagen, auch alternativ aktivierte Makrophagen genannt, lassen sich noch weiter in die Subpopulationen M2a, M2b und M2c unterteilen. Mantovani et al. konnten zeigen, dass M2a durch IL-4 und IL-13, M2b durch Immunkomplexe und Toll-*like*-Rezeptoren und M2c durch IL-10 und Glukokortikoide aktiviert werden. Es wird dabei ausgegangen, dass M2c-Makrophagen die Immunantwort herunterregulieren¹¹.

Makrophagen können unterschiedliche Aufgaben erfüllen und sind zur Phagozytose fähig. Dabei sind sie in der Lage Mikroorganismen zu erkennen, aufzunehmen und zum Teil intrazellulär zu zerkleinern. Zum anderen können sie diese zerkleinerten Bestandteile über MHCII-Moleküle an ihrer Zelloberfläche präsentieren und regen T-Helfer-Zellen zur Proliferation an. Daher werden sie wie die dendritischen Zellen auch als antigenpräsentierende Zellen bezeichnet.

Auch wenn Makrophagen und dendritische Zellen gleichen Ursprungs sind und zum Teil die gleichen Funktionen erfüllen, lassen sie sich dennoch phänotypisch unterscheiden. Ein wichtiges Oberflächenantigen ist CD163, welches hauptsächlich auf Makrophagen gebildet wird und sich somit als Unterscheidungsmerkmal eignet¹². Das auch als *hemoglobin-haptoglobin scavenger receptor* bezeichnete Antigen wird u.a. durch IL-4 heraufreguliert und kennzeichnet M2-Makrophagen¹³. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Monozyten und Makrophagen diesen Rezeptor basal bereits hoch exprimieren und IL-10 sowie Glukokortikoide die Expression nochmals steigern können¹⁴⁻¹⁶. Da auch andere Zellen den Rezeptor exprimieren, kann er allerdings nicht als alleiniger M2-Marker herangezogen werden¹⁷.

Die M2-*like* Makrophagen sind in der Produktion angiogenetischer Faktoren und immunsuppressiver Moleküle beteiligt und begünstigen damit die Tumorentstehung¹⁸⁻²⁰.

1.2.3 slan⁺ Zellen

slan (M-DC8 oder 6-sulfo LacNac) ist eine Kohlenhydrat-Modifikation von *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1) und wird von 0,5-2% aller mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) exprimiert²¹. slan⁺ Zellen teilen viele phänotypische und funktionelle Eigenschaften mit anderen humanen DCs und wurden daher ursprünglich als slanDCs bezeichnet²²⁻²⁴. Eine wichtige Rolle wird ihnen in der antitumoralen Immunantwort zugeschrieben, da sie daran beteiligt sind Tumorzellen zu bekämpfen oder auch zytotoxische natürliche Killerzellen, die gegen den Tumor gerichtet sind, zu aktivieren²⁵. Ihr pro-inflammatorisches Potential ist durch die Produktion von IL-12 und TNF- α gekennzeichnet²⁴.

Leeuwen-Kerkhoff et al. gehen im Gegensatz zu vielen anderen Autoren mittlerweile davon aus, dass slan⁺ Zellen eher einer Monozytenpopulation zuzuordnen sind²⁶. In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit phänotypische Eigenschaften von mo-DCs mit slan⁺ Zellen, einer *in vivo* relevanten Zellpopulation, vergleichbar sind.

1.3 Monozyten-gereifte dendritische Zellen: *in vitro*

Zur *in vitro* Generierung von *monocyte-derived dendritic cells* wurden verschiedene Ansätze entwickelt um isolierte Monozyten zu dendritischen Zellen ausreifen zu lassen. Bei einem Ansatz werden CD14⁺ PBMCs in Anwesenheit von IL-4 und GM-CSF über mehrere Tage kultiviert. Anschließend werden diese Zellen mit Reifungsstimuli behandelt, die sich je nach Protokoll unterscheiden.

Etabliert hat sich die Kombination aus pro-inflammatorischen Zytokinen und Prostaglandin²⁷. Jonuleit et al. kultivierten in einem zweischrittigen Verfahren zunächst PBMCs und stimulierten diese nach sieben Tagen mit IL1- β , IL-6, TNF- α und PGE₂²⁷.

Ein weiteres Konzept neben der Entwicklung aus Monozyten ist die Ausdifferenzierung aus CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen.

Für diese Arbeit wurde der Ansatz aus isolierten CD14⁺ Monozyten gewählt. Die Effekte der einzelnen Komponenten des Stimulus-Cocktails von Jonuleit et al. auf die Differenzierung der dendritischen Zellen wurden genauer untersucht und sind nach wie vor Gegenstand der Forschung und auch Teil dieser Arbeit.

TNF- α wird vor allem von Monozyten und Makrophagen selbst produziert und löst eine Immunantwort aus. Auf dendritischen Zellen reguliert das Zytokin MHC I und MHC II sowie die kostimulierenden Moleküle CD80 und CD86 hoch und führt zu einer verstärkten T-Zell-Stimulation²⁸.

PGE₂ wird von APCs produziert und dient allgemein als Immunmodulator²⁹. Es konnte gezeigt werden, dass PGE₂ die terminale Ausdifferenzierung von mo-DCs fördert und die Expression von MHC und kostimulierenden Molekülen steigert^{27,30,31}. Eine wichtige Eigenschaft ist die vermehrte Expression der Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR4 auf reifen dendritischen Zellen, welche die Migration zu den Chemokinen CCL19/MIP-3 β und CCL21/SLC bedingt³⁰. Dies spielt insofern eine wichtige Rolle, da Chemokine unreife dendritische Zellen, die entsprechende Rezeptoren ausbilden, zu den entscheidenden Stellen im Körper, wie die T-Zell-Zone in Lymphknoten, navigieren³²⁻³⁴. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die T-Zell-Proliferation als Antwort auf Alloantigene bei PGE₂-stimulierten mo-DCs verstärkt war³⁵. Dies ist eine entscheidende Eigenschaft, die mo-DCs als Therapeutikum interessant macht. Allerdings konnte ebenfalls gezeigt werden, dass PGE₂ dosisabhängig die IL-12-Produktion hemmt, was sich wiederum negativ auf das T-Zell-Priming auswirkt³⁶.

1.4 Interleukin 10: Vermittler der Immuntoleranz

1.4.1 Tolerogene dendritische Zellen

Das Wort Toleranz entstammt dem lateinischen *tolerare* und bedeutet ertragen und erdulden. Für unser Immunsystem ist es wichtig eine Balance zwischen einer proinflammatorischen Immunantwort gegenüber Pathogenen und einer Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen zu finden. Dies erfolgt sowohl zentral reguliert (z.B. Aussortierung autoreaktiver Zellen im Thymus) als auch in der Peripherie des Körpers auf verschiedenen Ebenen. Auf zellulärer Ebene tragen verschiedene Zelltypen zur Aufrechterhaltung dieses Gleichgewichts bei. Zu diesen zählen auch die sogenannten tolerogenen dendritischen Zellen (tolDCs).

Aufgrund der hohen Plastizität des mononukleären-phagozytären Systems weisen sowohl tolerogene dendritische Zellen als auch Makrophagen und myeloiden Suppressorzellen

Einleitung

(MDSCs)³⁷ tolerogene Charakteristika auf, sodass die Definierung einer tolerogenen APC erschwert wird. Dies erfordert weitergehende Untersuchungen bezüglich der phänotypischen und funktionellen Eigenschaften dieser Zellen. Eine wichtige Eigenschaft tolerogener dendritischer Zellen ist die Induktion von regulatorischen T-Zellen, wobei in den letzten Jahren viel zu den (FoxP3⁺) regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) geforscht wurde.

Klinisch äußert sich die Dysbalance des Immunsystems beispielsweise in Form autoimmuner Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, Typ 1 Diabetes oder der Multiplen Sklerose, aber auch der akuten Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD), bei der das Allograft eine Aktivierung von T-Helfer-Zellen (T_{H1} und T_{H17}) bedingt und somit Toleranz gegenüber dem Spenderorgan verhindert. Dementsprechend groß bleibt das Interesse an tolerogenen APCs, die in der Lage sind diese Zellen zu regulieren, die wiederum in der Therapie autoimmuner Erkrankungen, GvHD und Krebs eingesetzt werden können.

MDSCs, ursprünglich in den 1980er Jahren in Tumor-Patienten entdeckt, werden aufgrund ihrer induzierenden Wirkung als Therapeutikum in der Transplantationsmedizin erforscht und angewandt³⁸.

In vitro haben sich verschiedene anti-inflammatorische Verfahren etabliert, die einen induzierenden Phänotyp von dendritischen Zellen fördern. Beispiele hierfür sind der Einsatz von IL-10, Rapamycin, Dexamethason und Vitamin D sowie niedrigen Dosen von GM-CSF³⁹⁻⁴¹. Festzuhalten ist, dass sich *in vitro* aus Monozyten abhängig vom Stimulus sowohl dendritische Zellen, tolerogene dendritische Zellen, Makrophagen als auch myeloide Suppressorzellen entwickeln können, wobei die verschiedenen Differenzierungswege, resultierenden Phänotypen und funktionellen Eigenschaften nach wie vor Gegenstand der Forschung wie auch dieser Arbeit sind.

1.4.2 Interleukin 10 (IL-10)

Unter IL-10 ausgereifte dendritische Zellen *in vitro* werden oft als tolerogene DCs beschrieben, die regulatorische T-Zellen stimulieren und somit zur tolerogenen Immunlage beitragen können³⁹.

Einleitung

IL-10 wurde ursprünglich als Zytokin entdeckt, das von Typ2-T-Helferzellen (T_{H2}) produziert wird und die Typ1-T-Helferzell- (T_{H1}) Funktion unterdrückt. Mittlerweile weiß man über das Zytokin, dass es sowohl immunsuppressive als auch immunstimulatorische Eigenschaften hat⁴². So wirkt IL-10 auf antigenpräsentierende Zellen vor allem immunsuppressiv, während es auf B-Zellen, Mastzellen oder natürliche Killerzellen immunstimulierende Eigenschaften besitzt⁴³.

Dabei bindet IL-10 an einen heterodimeren IL-10 Rezeptor Komplex, der aus der IL-10R2 Untereinheit, die konstitutiv exprimiert wird, und der IL-10R1 Untereinheit, die induziert werden kann, besteht⁴⁴. Während nicht vollständig ausgereifte dendritische Zellen sensitiv für IL-10 sind, geht man davon aus, dass ausgereifte dendritische Zellen das Zytokin nicht mehr binden, da sie die Untereinheit IL-10R1 nicht mehr exprimieren⁴⁵. Somit ist der Zeitpunkt der Stimulation entscheidend für die Differenzierung der Zelle. Nach Bindung an das Dimer wird JAK, eine zytoplasmatische Tyrosinkinase, aktiviert, was letztendlich zur Phosphorylierung und Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT1, STAT3 und STAT5 führt⁴⁶. Dem gegenüber steht ein zweiter Signalweg, welcher über PI3K/AKT läuft und die Expression von pro-inflammatorisch wirkenden Genen unterdrückt⁴⁷.

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass IL-10 *in vitro* auf humanen generierten myeloiden Zellen die Expression von MHCII-Molekülen, den Reifungsmarker CD83 sowie kostimulierende Moleküle wie CD80 und CD86 unterdrückt⁴⁸. Damit verlieren diese Zellen ihre stimulierende Aktivität auf T-Zellen. Diese Eigenschaft machen sich u.a. Tumorzellen zu Nutze, die IL-10 produzieren können und sich somit einer effektiven Immunantwort entziehen⁴⁹.

In früheren Untersuchungen wurden bereits Populationen unter den Einfluss von IL-10 auf Monozytenkulturen beschrieben. 1997 beschrieben Steinbrink et al. den Effekt von IL-10 auf die Ausbildung kostimulierender Moleküle und Funktion humaner dendritischer Zellen⁵⁰. Die Zellen erhielten in der neun- bis elftägigen Kultur für die letzten zwei Tage IL-10 und zeigten eine reduzierte Heraufregulierung von CD58, CD83 und CD86. Es wurde folglich angenommen, dass IL-10 die Entwicklung zur vollständig ausgereiften dendritischen Zelle verhindert. Allavena et al. zeigten 1998, dass Monozyten unter GM-CSF und IL-13 die Funktion und Morphologie dendritischer Zellen annehmen, aber der zusätzliche Stimulus mit IL-10 dieser Entwicklung entgegenwirkt und die Zellen in Richtung reife Makrophagen differenzieren⁵¹. 2000 zeigten Ancuta et al., dass sich

Einleitung

humane Monozyten *in vitro* unter Stimulation von GM-CSF, IL-4 und IL-10 (die Kombination, die auch in dieser Arbeit verwendet wurde) nach sechs Tagen in eine CD14⁺CD16⁺⁺ Zellpopulation entwickeln, die phänotypisch durch die Expression der dendritischen Zellmarker CD40, CD80, CD86, HLA-DR, CD11b, CD11c, CD18, CD1a und CD83 gekennzeichnet waren⁵². Die Zugabe von IL-10 erfolgte hier bereits am ersten Tag zusammen mit IL-4 und GM-CSF. 2004 wurden von Li et al. CD14⁺CD16⁺⁺ Zellen beschrieben, die sich unter dem Einfluss von IL-10, M-CSF und IL-4 aus humanen Monozyten entwickelten und ebenfalls durch die Expression dendritischer Zellmarker wie CD80, CD83, CD86 und HLA-DR sowie einer reduzierten *mixed lymphocyte reaction* (MLR) definiert wurden⁵³. Im selben Jahr wurde eine Subpopulation IL-10-stimulierter CD14⁺ dendritischer Zellen beschrieben, die u.a durch die Expression inhibitorischer Moleküle wie ILT2, ILT3, ILT4, ILT5 gekennzeichnet waren⁵⁴.

Gregori et al. charakterisierten 2010 erstmalig DC-10: dendritische Zellen, die selbst IL-10 produzieren und eine Untergruppe tolerogener dendritischer Zellen darstellen und den CD14^{bright}CD16⁺ Zellen zugeordnet wurden⁵⁵. Zusätzlich exprimierten die Zellen CD40, CD83, CD86 und HLA-DR. Dieser Zelltyp machte *in vivo* 0,3% der mononukleären Zellen gesunder Probanden aus und repräsentierte 3,1% aller Zellen in der Milz der Probanden. Die Forschergruppe zeigte, dass DC-10 auch *in vitro* in siebentägiger Kultur aus Monozyten unter Zugabe von IL-10, GM-CSF und IL-4 heranreifen und vergleichbar mit den peripheren Zellen *in vivo* waren. Die aus Monozyten gereiften DC-10 exprimierten HLA-DR, CD40, CD80, CD83 und im Gegensatz zu iDCs und mDCs vermehrt CD163.

Interessanterweise sind DC-10 in Patienten mit akuter myeloischer Leukämie vermehrt vorhanden, sodass die Vermutung aufgestellt wurde, dass leukämische Zellen durch DC-10 einer effektiven Immunantwort entzogen werden⁵⁶.

Die Eigenschaften der DC-10 und ihre Funktion *in vivo* will man sich in der Behandlung von Allergien und autoimmunen Erkrankungen zu Nutze machen. Ein Ansatz ist die Generierung antigenspezifischer regulatorischer T-Zellen⁵⁷. Dazu werden *in vitro* autologe DC-10 nach Stimulation mit IL-10, GM-CSF und IL-4 mit Antigenen beladen und die Differenzierung autologer antigen-spezifischer regulatorischer T-Zellen (T_{reg1}) induziert, sodass eine Toleranz zur Behandlung dieser Erkrankungen wiederhergestellt werden soll.

Die vorliegende Arbeit befasst sich ebenfalls mit der Entwicklung von humanen Monozyten unter IL-10-Einfluss und ihre Differenzierung in verschiedene Subpopulationen und deren Expression von Oberflächenmolekülen, Phagozytoseaktivität wie auch Sekretion von Zytokinen.

1.5 Dendritische Zelle als Tumorstoffimpfung

In den letzten Jahrzehnten gab es viele Bestrebungen dendritische Zellen als Tumorstoffimpfung einzusetzen⁵⁸⁻⁶⁰. Erste Ansätze gab es bereits 1996 als Patienten mit follikulärem B-Zell-Lymphom *ex vivo* autolog beladene dendritische Zellen in drei bis vier Serien mit Erfolg injiziert wurden⁶¹. Viele weitere klinische Versuche folgten bereits in den 1990er Jahren insbesondere bei Patienten mit malignem Melanom, wobei neben anfangs monotherapeutischen Ansätzen^{62,63} auch kombinierte therapeutische Strategien mit Chemotherapeutika heutzutage angewandt werden⁶⁴. Die grundlegenden Eigenschaften der dendritischen Zellen, die sie als Stoffimpfung nützlich machen, sind (Tumor-)Antigene zu erkennen, aufzunehmen, zu prozessieren und T-Zellen anschließend zu präsentieren. Im peripheren Gewebe sind unreife dendritische Zellen in der Lage die Antigene aufzunehmen, was aber mangels kostimulierender Moleküle (CD80 und CD86) zu Immuntoleranz führen kann. Dies geschieht unter anderem durch die Beseitigung von T-Zellen oder die Induktion von regulatorischen T-Zellen und entzieht dem Tumor einer ausreichenden Immunantwort^{65,66}. Aktivierte, ausgereifte dendritische Zellen, die mit einem Antigen beladen wurden, sind hingegen in der Lage antigen-spezifische T-Zellen in Richtung T_{Effektor}-Zellen und Immunantwort zu stimulieren. Die Ausreifung der dendritischen Zellen bedingt dabei eine verminderte Antigen-Aufnahme, eine Hochregulierung der kostimulierenden Moleküle und MHCII sowie die Expression des Chemokin-Rezeptors CCR7, welcher die Migration der Zelle steuert⁶⁷. Diese Eigenschaften macht man sich in der Medizin und der Therapie von Tumorerkrankungen zu Nutzen⁶⁸.

Dendritische Zellen können auf verschiedene Art als Stoffimpfung eingesetzt werden. Zum einen besteht die Möglichkeit die Zellen mit Proteinen/Antigenen *in vivo* direkt zu stimulieren oder die Antigene vorher an DC-spezifische Antikörper zu koppeln. Zum anderen kann man dendritische Zellen *ex vivo* mit Antigenen stimulieren und im ausgereiften Zustand dem Patienten injizieren⁶⁹. Variationen bezüglich dieses Ansatzes

sind unterschiedliche Populationen dendritischer Zellen, Reifungsstimuli, Antigene oder auch die Art der Applikation⁷⁰. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Therapieform sicher ist und eine Proliferation von CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen bedingen^{59,71,72}. Mittlerweile gibt es klinische Phase-III-Studien, die die Wirksamkeit von mo-DCs testen. Zum einen werden diese als Vakzine bei Patienten mit Glioblastom zusätzlich zur Radio- und Chemotherapie getestet (NCT00045968; Northwest Therapeutics) und die Zellen vorher mit autologem Tumorlysate beladen. Zum anderen werden mo-DCs bei Patienten mit fortgeschrittenem Nierenkarzinom mit autologer Tumor-RNA beladen und als zusätzliche Therapie zu Sunitinib verwendet (NCT01582672). Eine weitere klinische Studie testet die Effektivität autologer dendritischer Zellen bei Patienten mit Melanom (NCT01875653). In Würzburg wird aktuell die Wirksamkeit einer Kombinationstherapie von autologen Tumorlysate-beladenen dendritischen Zellen und Cyclophosphamid bei Kindern und Jugendlichen mit hochgradig malignem Gliom nach Tumoresektion und Rückfall in einer Phase-I/II-Studie evaluiert (HGG Rez Immunovac, EudraCT 2013 – 000419 -26).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Dendritische Zellen, die in dieser Arbeit untersucht werden, können in der Therapie von Tumorerkrankungen als auch Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden, sodass deren Entwicklung und detaillierte Erforschung *in vitro* von großer Relevanz ist.

Das Zytokin IL-10 gilt in der Literatur als Induktor tolerogener dendritischer Zellen^{50,57,73,74}. Es wird angenommen, dass durch den Einfluss von IL-10 eine Ausdifferenzierung von unreifen zu reifen dendritischen Zellen unterdrückt wird und die Zellen in einem unreifen Stadium bleiben. Bereits 1997 postulierten Steinbrink et al., dass durch IL-10 eine Ausdifferenzierung unreifer dendritischer Zellen zu reifen CD83⁺ dendritischen Zellen verhindert wird und die Oberflächenantigene CD86 und CD58 herunterreguliert werden⁵⁰. In einer 2016 erschienenen Studie, ebenfalls aus der Arbeitsgruppe von Steinbrink, konnte gezeigt werden, dass die unter IL-10 gereiften dendritischen Zellen, und folglich als IL-10DCs bezeichnete Zellen, in zwei Subpopulationen aufgeteilt werden können: CD83^{high} IL-10DCs und CD83^{low} IL-10DCs⁷⁵. Entscheidend für die anteilmäßige Verteilung der Subpopulationen war die Höhe der Konzentration von IL-10, die am fünften Tag den iDCs hinzugefügt wurde. 20 ng/ml oder höhere Konzentrationen induzierten den

Einleitung

typischen Phänotyp tolerogener IL-10DCs mit reduzierter CD83-Expression und erhöhter CD14-Expression im Vergleich zu mDCs. Demgegenüber resultierten geringere Konzentrationen an IL-10 zu einer Entwicklung von reifen CD83^{high}CD14^{low} DCs. Diese exprimierten vermehrt die Oberflächenantigene CD80, CD86 und HLA-DR, vergleichbar mit der Expression von reifen inflammatorischen mDCs. Das Oberflächenantigen CD14 hingegen wird allgemein als Zeichen eines unreifen Phänotyps und als Charakteristikum tolerogener dendritischer Zellen angesehen^{76,77}. Dementsprechend scheint IL-10 das Reifungsstadium dendritischer Zellen zu beeinflussen.

In dieser Arbeit soll der tolerogene und als unreif charakterisierte Phänotyp dieser Zellen sowohl in der morphologischen als auch in der funktionellen Dimension sorgfältig analysiert werden. Es wird der Frage nachgegangen, welchen Einfluss IL-10 auf den Reifungsprozess der dendritischen Zellen hat. Dabei wird die Ausdifferenzierung zwei verschiedener Zellpopulationen aus humanen Monozyten *in vitro* nach Reifung zu iDCs und konsekutiver IL-10-Stimulation, insbesondere in Kombination mit einem TLR-Stimulus, detailliert betrachtet. Neben einer phänotypischen Charakterisierung dieser zwei Zellpopulationen, werden die Zellen anhand ihres Zytokinprofils auch funktionell analysiert. Mit der Betrachtung von slan⁺ Zellen, einer *in vivo* zirkulierenden Zellpopulation, und nach erfolgter IL-10-Stimulation soll die Übertragbarkeit auf zelluläre Vorgänge *in vivo* verbessert werden.

Ziel der Untersuchungen soll auch sein, durch ein besseres Verständnis der *in vitro* Ausdifferenzierung dendritischer Zellpräparate neue zelltherapeutische Strategien zu entwickeln.

2 Material

2.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Firma
Brutschrank	Heracell 240	Thermo Fisher
Deckglas	Haemocytometer	Hartenstein
Durchflusszytometer	BF FACS Canto II	BD Biosciences
Gefrierschrank	-	Liebherr
Inverses Mikroskop	Leica DM IL	Leica
Kühlschrank	-	Liebherr
Lagerbehälter	Biosafe©	Cyrotherm
MACS Magnete	Quadro, Octo	Miltenyi Biotec
Mikroskop	Kolleg SHB45	Eschenbach
Mikroplattenphotometer	TECAN GENios	Tecan Group
Freezing Container	NALGENE™ Cryo	Thermo Fisher
Pipetten	-	Eppendorf
Pipettierhilfe (automatisch)	accu-jet pro	Brand Scientific
Sicherheitswerkbank	HeraSafe	Thermo Fisher
Tiefkühlschrank	-	Liebherr
Zählkammer	Neubauer improved	Hartenstein
Zentrifuge	Rotanta 460 RS	Hettich

Tabelle 1: Geräte

2.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Beschreibung	Firma
Eppendorf Tubes	Safe Seal 1,5ml	Greiner Bio-One
Cyrovials	2ml	Biozym Scientific
Mikrotitrierplatten	6, 12, 48, 96 Vertiefungen	Thermo Fisher
Mikrotitrierplatten ELISA	96 Vertiefungen	eBioscience
Pipettenspitzen	20µl, 200µl, 1000µl	Sarstedt
Stabpipetten	5ml, 10ml, 25ml	Greiner Bio-One
Zentrifugenröhrchen	15ml, 50ml	Fisher Scientific

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

2.3 Lösungen, Medien und Puffer

Bezeichnung	Hersteller
Biocoll Separating Solution	Biochrom
CellGro©	CellGenix
Deionisiertes Wasser	Sigma-Aldrich
DPBS	Life Technologies Limited
FACS Flow	BD Biosciences
FACS Rinse	BD Biosciences
Humanserum (Type AB)	Biochrom
Tween®	Carl Roth

Tabelle 3: Lösungen, Medien und Puffer

2.4 Wachstumsfaktoren und Stimuli

Bezeichnung	Hersteller
Brefeldin A (1000X)	BioLegend
Dextran, Alexa Fluor™ 647 (10,000 MW, anionic, fixable)	Thermo Fisher
GM-CSF	Gentaur
IFN- γ	PeptoTech
IL-1 β	cellGenix
IL-4	PeptoTech
IL-10	PeptoTech
Lipopolysaccharid (E. coli 055:B5)	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin (100X)	GE Healthcare (PAA)
Prostaglandin E ₂	Sigma-Aldrich
R848	InvivoGen
TNF- α	PeptoTech

Tabelle 4: Wachstumsfaktoren und Stimuli

2.5 Antikörper

Antikörper	Klon	Konjugat	Hersteller
CD14	MφP9	PE	BD Biosciences
CD36	eBioNL07	PerCpCy5.5	eBioscience
CD80	2D10	PerCpCy5.5	BioLegend
CD83	HB15e	Brilliant Violet 421™	BioLegend
CD85d	42D1	APC	eBioscience
CD85k	ZM4.1	APC	eBioscience
CD86	IT2.2	PerCPCy5.5	BioLegend
CD91	A2MR-a2	APC	eBioscience
CD163	GHI/61	FITC	BioLegend
CD206	15-2	FITC	BioLegend
CD273	MIH18	APC	BioLegend
CD274	MIH1	FITC	BD Biosciences
CD279	MIH4	FITC	eBioscience
CX3CR1	2A9-1	PerCpCy5.5	BioLegend
Viability Dye	-	eFluor® 780	eBioscience
IL-12//IL-23p40	eBioHP40	PE	eBioscience
IL-8	E8N1	APC	BioLegend
TNF-α	MAb11	PerCpCy5.5	BioLegend

Tabelle 5: Antikörper

2.6 Kits

Bezeichnung	Hersteller
Anti-CD14 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec
Human IL-6 Uncoated ELISA	Thermo Fisher
Slan (M-DC8)+ Monocyte Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec
TARC Human ELISA Kit	Thermo Fisher

Tabelle 6: Kits

2.7 Software

Software
Autodesk Sketchbook® 2017
BD FACSDiva™ Software
FlowJo 7.6.5
Graphpad Prism 7
Microsoft® Word 2015
Microsoft® PowerPoint 2015

Tabelle 7: Software

2.8 Firmenverzeichnis

Firma
BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Biochrom, Berlin, Deutschland
BioLegend, San Diego, CA, USA
Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Brand Scientific, Mannheim, Deutschland
Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
CellGenix, Freiburg, Deutschland
Cyrotherm, Kirchen (Sieg), Deutschland
eBioscience, San Diego, CA, USA
Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eschenbach, Nürnberg, Deutschland
Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
GE Healthcare (PAA), Solingen, Deutschland
Gentaur, Aachen, Deutschland
Greiner Bio-One, Kremsmünster, Deutschland
Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Hettich, Kirchlengern, Deutschland
InvivoGen, San Diego, CA, USA
Leica, Wetzlar, Deutschland
Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland
Life Technologies Limited, CA, USA

Material

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
PeproTech, Hamburg, Deutschland
Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA

Tabelle 8: Firmenverzeichnis

3 Methoden

3.1 Ethikvotum

Für die Arbeit wurde Material verwendet, das unter dem Ethikvotum Nr. 04/09 vom 19.01.2009 von der Transfusionsmedizin, anonymisiert, erhalten wurde.

3.2 Isolation von PBMCs durch Dichtegradientenzentrifugation

Zur Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) wurden Leukozytenfilter aus der Transfusionsmedizin des Uniklinikums Würzburg verwendet. Die Leukozytenfilter entstehen als Nebenprodukt bei der Herstellung von Thrombozytenkonzentraten. Für die Arbeit wurde das Blut von anonymen, gesunden Spendern verwendet.

Zunächst wurde das Blut zu je 5 ml auf 50 ml-Falcons verteilt und mit 10 ml PBS (1% HS) suspendiert. Anschließend wurde die Suspension mit 12 ml Ficoll-Isopaque-Separationslösung mit einem spezifischen Gewicht von 1,077 g/ml vom Boden aus unterschichtet. Nach Dichtegradientenzentrifugation (1400 rpm, 15 min, 20°C, R9) ist eine Schichtung der Bestandteile erkennbar, wobei ein weißer Leukozytenring, auch *buffy coat* genannt, abgrenzbar ist und die PBMCs enthält. Diese Grenzschicht wurde vorsichtig mit Hilfe einer sterilen 50 ml-Stabpipette abgesaugt und in ein neues 50 ml-Falcon überführt. Aufgefüllt mit PBS (1% HS) wurde dieses erneut zentrifugiert (1600 rpm, 10 min, 4°C), der Überstand abgesaugt und dieser Zentrifugationsschritt wiederholt. Das Zellpellet wurde erneut in PBS (1% HS) resuspendiert und ein letztes Mal, um die Thrombozytenzahl zu reduzieren, zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, 4°C, R9). Vor diesem Schritt wurde ein Aliquot der Zellen zur Zellzählung an einem automatischen Zellzählgerät (ADVIA) entnommen. Das Ergebnis wurde entsprechend der Verdünnung des Aliquots und Zellsuspension berechnet. Ein Leukozytenfilter erbrachte 200-1000 x 10⁶ Zellen.

Zuletzt wurden die PBMCs auf Vials verteilt (100 x 10⁶ Zellen/Vial), wobei ein Einfriermedium von 800 µl CellGro, 800 µl HS und 160 µl DMSO pro Vial verwendet wurde. Die Vials wurden über 24 h zunächst bei -80°C gelagert und anschließend in einen Stickstofftank bei -190°C überführt, wo sie zur weiteren Verwendung zur Verfügung standen.

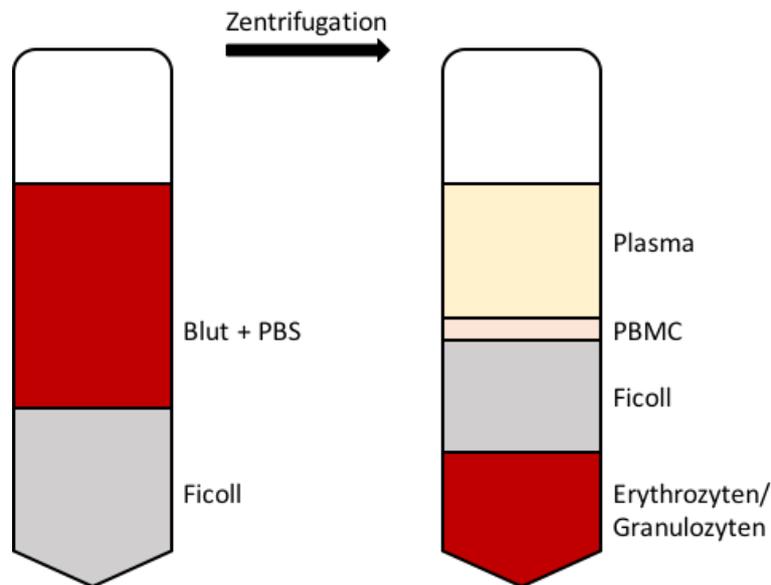


Abbildung 2: Dichtegradientenzentrifugation

Mittels Dichtegradientenzentrifugation werden die Zellen anhand ihrer Dichte in verschiedene Phasen getrennt. Es grenzt sich ein weißer Leukozytenring (PBMC) ab, der die Monozyten und Lymphozyten enthält.

3.3 Zellkultur

3.3.1 Generierung von Monozyten-gereiften dendritischen Zellen

Unter dem mehrtägigen Einfluss von IL-4 und GM-CSF reifen humane Monozyten *in vitro* zu unreifen dendritischen Zellen heran. Dazu wurden verschiedene Protokolle und Inkubationszeiten beschrieben.

Zur Generierung von unreifen dendritischen Zellen wurden die isolierten PBMCs genutzt. Die im Stickstofftank gelagerten Vials mit den Zellen wurden erwärmt und in PBS (1% HS) überführt. Anschließend wurden diese abzentrifugiert (1700 rpm, 4 min, 20°C) und abhängig von der Größe des Pellets in PBS (1% HS) resuspendiert. Die Zellzahl wurde anschließend mittels Neubauer Zählkammer bestimmt:

Dazu wurden die 10 µl der Zellsuspension mit dem Farbstoff Trypanblau im Verhältnis 1:10 verdünnt und in die Neubauer Zählkammer pipettiert. Trypanblau wird nicht von lebenden Zellen aufgenommen und grenzt somit diese beim Zählen von den abgestorbenen ab. 10 µl der Verdünnung wurden mit der Pipette aufgenommen. Durch Kapillarkraft wird die Teilchensuspension unter das Glasplättchen der Zellkammer

gezogen, sodass sich unter dem Durchlichtmikroskop die Anzahl der Zellen je Volumeneinheit berechnen lässt. Dazu wurden die vitalen Zellen von zwei der neun Quadrate gezählt und dann durch zwei geteilt um einen mittleren Wert pro Quadrat zu erhalten. Da ein Feld die Kantenlänge von 1 mm hat und das Deckglas einen Zwischenraum von 0,1 mm über der Zellkammer liegt, entspricht dieser Raum $0,1 \text{ mm}^3$, also $0,1 \text{ } \mu\text{l}$. Deswegen wurde die berechnete Anzahl zunächst mit 10 multipliziert um die Zellzahl pro μl zu ermitteln. Anschließend wurde mit der entsprechenden Verdünnung multipliziert, sodass man die Gesamtzahl der PBMCs pro Vial erhielt, die im Schnitt zwischen 200 und 400×10^6 Zellen lag.

Die Zellen wurden abzentrifugiert und in Zellkulturmedium (CellGro) im Verhältnis 10^7 Zellen/ml resuspendiert. Es wurden 2 ml Zellsuspension pro Well in eine 6 Well Multiwell Platte gegeben und bei 37°C für 2 h im Brutschrank inkubiert.

Danach wurden die Wells vorsichtig vom Überstand mit den nicht-adhärenenten Zellen komplett getrennt. Die plastik-adhärenenten Zellen wurden erneut in eine 3 ml Nährlösung aus CellGro, Humanserum (1%), GM-CSF (800 U/ml) und IL-4 (100 U/ml) gegeben. Es erfolgte eine erneute Inkubation im Brutschrank bis zur weiteren Behandlung der herangereiften Zellen.

3.3.2 Reifung dendritischer Zellen

Je nach Experiment wurden nach einer 48- bis 72-stündigen Differenzierung der Monozyten zu iDCs die Zellen durch verschiedene Reifungstrigger stimuliert. Zunächst wurden die Zellen vor der Stimulation abgeerntet und zentrifugiert (1700 rpm, 4 min, 20°C). Dann erfolgte eine Resuspension in CellGro, Humanserum (1%), GM-CSF (800 U/ml) und IL-4 (100 U/ml) und die Zugabe des entsprechenden Reifungsstimulus. Das Zytokin IL-10 (40 ng/ml) und PIK-75 (10 nM), ein PI3K Inhibitor, der gezielt die Signaltransduktion für Zellproliferation, - wachstum, und differenzierung beeinflusst, wurden eine Stunde vor den weiteren Reifungstriggern zugegeben. Nach der einstündigen Präinkubation im Brutschrank (37°C , 5% CO_2) erfolgte dann der Reifungsstimulus durch die TLR-Trigger R848 (2 mg/ml) oder LPS (30 ng/ml) oder einem etabliertem Zytokinmix mit PGE_2 (1 mg/ml), IL-1- β (10 ng/ml) und TNF- α (10 ng/ml). Die unterteilten Gruppen wurden für weitere 24 – 48 h im Brutschrank zur Ausdifferenzierung inkubiert und dann ausgewertet.

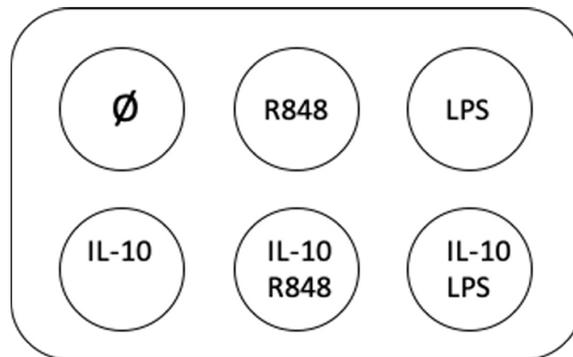


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Zellkulturen

Die iDCs wurden in 6 Well Multi Well Platten mit verschiedenen Reifungsstimuli behandelt und für 24 - 48 h im Brutschrank inkubiert.

3.4 Zeldepletion und -elution

3.4.1 LD-Säulen

Um nur mit bestimmten Zellen weiter zu arbeiten, wurden Zellen mit entsprechenden Oberflächenantigenen aus der Ursprungspopulation depletiert. Dazu wurden LD-Säulen verwendet. In der Versuchsreihe zur Isolierung sog. slan⁺ Zellen wurden CD3-positive Zellen depletiert.

Nach Zählung der PBMCs wurden die Zellen abzentrifugiert und das Pellet in 300 µl Puffer, bestehend aus PBS und 1% HS, resuspendiert und mit 100 µl Anti-CD3 MicroBeads, superparamagnetische Beads mit kovalent an die Oberfläche gebundene Anti-CD3-Antikörper, je 10⁸ Zellen beladen. Die eisenhaltigen Beads werden unter Einfluss eines magnetischen Feldes festgehalten, sodass die Antikörper mit unterschiedlicher Affinität an ausgewählte Oberflächenmoleküle binden können. Um die Spezifität der Methode zu erhöhen, wurden die Fc-Rezeptoren auf den Zellen mit 100 µl FcR Blockierungsreagenz geblockt. Nach 20-minütiger Bindungsphase auf Eis wurden die Zellen abzentrifugiert, in 500 µl Puffer je 10⁸ Zellen resuspendiert und auf eine LD-Säule gegeben, sodass nicht-gebundene Zellen die Säule passierten, während Beadsgekoppelte CD3-positive Zellen gebunden wurden. Die Säule wurde mit 3 ml Puffer nachgespült um den Ertrag CD3-negativer Zellen zu erhöhen. Mit der negativen Zellfraktion wurde dann weitergearbeitet.

3.4.2 MS-Säulen

Mit MS-Säulen können Zellen depletiert oder selektiert werden. Einerseits wurden unreife dendritische Zellen mit Anti-CD14 MicroBeads gekoppelt um nach Depletion mit der CD14-negativen Zellfraktion fortzufahren. Andererseits wurden in einer Versuchsreihe zur Isolierung von slan⁺ Zellen CD3-negative Zellen mit Anti-Slan (M-DC8) MicroBeads gebunden und durch Elution mit der positiven Zellfraktion weitergearbeitet. Dazu wurden die Zellen mit 200 µl Puffer und 50 µl Anti-CD14 MicroBeads je 10⁸ Zellen bzw. 400 µl Puffer und 100 µl Anti-Slan MicroBeads je 10⁸ Zellen abhängig vom Versuch versetzt. Nach 20 min auf Eis wurden die Zellen mit 1 ml Pufferlösung auf die MS-Säule gegeben und mit 1 ml Pufferlösung nachgespült. Damit wurden nur diejenigen Zellen gebunden, die für diesen Marker positiv waren. In einer Versuchsreihe wurden damit CD14-negative Zellen gewonnen und zur weiteren Zellreifung verschieden stimuliert.

In einer anderen Versuchsreihe wurden die slan⁺ Zellen aus der MS-Säule eluiert und in Zellkultur analog zu anderen Experimenten behandelt.

3.5 Durchflusszytometrie

3.5.1 Prinzip

Dieses Verfahren, auch FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) genannt, dient der Zellseparierung sowie -analyse und wurde 1968 von Wolfgang Göhde entwickelt und 1976 von Herzenberg beschrieben. Mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten spezifischen Antikörpern können Antigene quantitativ bestimmt und Zellen auf Oberflächenmarker oder auch intrazelluläre Marker analysiert werden. Grundlage des Prinzips ist ein Laserstrahl, der eine Emission von optischen Signalen hervorruft. Dabei wird zum einen das Streulicht der Zelle und zum anderen das Fluoreszenzsignal, das durch die Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper bedingt ist, erfasst. Das Streulicht spiegelt Informationen über Größe und Komplexität der Zelle wider. Das Vorwärtsstreulicht (FSC) ist ein Maß für die Größe, während das Seitwärtsstreulicht (SSC) Aussagen über die Granulität, also intrazelluläre Vesikel, sowie Form und Größe des Zellkerns trifft. Mit Hilfe dieser beiden Parameter lassen sich Zellpopulationen in einem x-y-Diagramm bestimmen, da z.B. Monozyten andere Eigenschaften als Granulozyten besitzen. Nach bestimmten Eigenschaften ausgewählte Populationen

können in der Analyse getrennt betrachtet werden. Diesen Vorgang nennt man auch *gating* (Abbildung 4).

Um die Zellpopulationen genauer zu bestimmen, markiert man die Zellen mit Antikörpern, die an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind. Ein Laserstrahl regt Elektronen der Fluoreszenzfarbstoffe an, die wiederum Photonen emittieren. Die Fluorochrome sind durch unterschiedliche Emissionsspektren gekennzeichnet. Photodetektoren erfassen die unterschiedlichen Emissionen und machen damit die gleichzeitige Analyse mehrerer Marker, wie z.B. Oberflächenantigene, möglich.

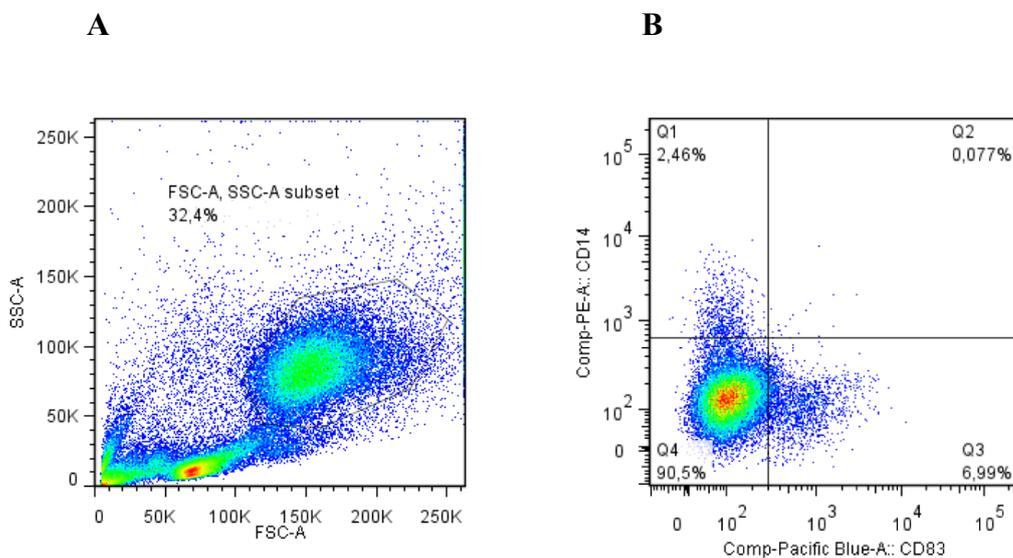


Abbildung 4: Gating von Zellpopulationen

A Die zu untersuchende Zellpopulation wurde durch Hilfe von Größe (FSC-A) und Granulいた (SSC-A) ausgewählt um dann genau charakterisiert zu werden. Gezeigt ist das *gate* von unreifen dendritischen Zellen nach viertägiger Kultur in CellGro, 1% HS, GM-CSF (800 U/ml) und IL-4 (100 U/ml). **B** Die ausgewählte Population wurde dann auf ihre Antigenexpression untersucht. Dargestellt sind unreife dendritische Zellen hinsichtlich ihrer CD14- und CD83-Expression.

3.5.2 Kompensation

Bedingt dadurch, dass Fluorochrome ein ganzes Farbspektrum emittieren, kann es zur Überlagerung verschiedener Emissionen kommen, die ein falsch-positives Signal dann für einen anderen Farbstoff als den eigentlichen verursachen. Deshalb werden vor der Zellanalyse die Emissionsmaxima der verwendeten Farbstoffe in einem Kompensationsverfahren bestimmt und Überschneidungen rechnerisch kompensiert. Es wurden für die Versuche bis zu sechs Fluoreszenzen gleichzeitig gemessen.

3.5.3 Oberflächenantigen-Färbung

Am Tag der FACS-Analyse wurden die Zellen abgeerntet und für 30 min in PBS (1% HS) auf Eis gestellt. Der Überstand der Zellkultur wurde abgenommen und in Eppendorf-Tubes bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren. Die kalt gestellten Zellen wurden einmal in PBS resuspendiert und mit einem Viability-Dye Antikörper, 1:1000 verdünnt in PBS, für 30 min (4°C, dunkel) gefärbt. Die Zellen wurden erneut in PBS resuspendiert und dann mit den entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern, 1:50 in PBS (1% HS), für 45 min (21°C, dunkel) gefärbt. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und in PBS aufgenommen und mit einem FACS gemessen. Anschließend wurden die Daten mit dem Programm FlowJo 7.6.5 ausgewertet.

3.6 Funktionelle Methoden

Neben einer morphologischen und phänotypischen Beschreibung der Zellen wurden die Zellen auch funktionell untersucht. Dabei wurden zum einen die Zellen selbst als auch der Überstand mit den enthaltenden Zytokinen der Zellkultur untersucht.

3.6.1 Dextran-Assay: Makropinozytose

Um die Kapazität der Antigen-Aufnahme der Zellen zu bestimmen wurde die Dextran-Aufnahme getestet. Dazu wurden die Zellen 24 h nach ihrer Stimulation abgeerntet und für 30 min in PBS (1% HS) auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und in 500 µl vorgewärmten CellGro mit FITC-Dextran 10,000 MV (0,2 mg/ml) aufgenommen, in fünf 96 Well Platten verteilt und im Brutschrank für eine unterschiedliche Zeitdauer inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0, 20, 40 60 und 90 min nach Zugabe des Dextrans wurde jeweils eine Platte mit Zellen dem Brutschrank entnommen und die Antigen-Aufnahme durch Hinzufügen von 100 µl kaltem PBS gestoppt. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in 200 µl kaltem PBS aufgenommen und bis zur FACS-Analyse auf Eis gestellt. Nach 90 min wurde die letzte Platte entnommen, ebenfalls mit PBS behandelt und für 10 min auf Eis gestellt. Alle Zellen wurden dann einmal in PBS resuspendiert und mit den Antikörpern CD14 und CD83 für 45 min (21°C, dunkel) gefärbt und anschließend durch FACS-Analyse gemessen.

3.6.2 ELISA

Mit Hilfe des *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) lassen sich u.a. Peptide, Proteine, Antikörper oder Hormone detektieren und quantifizieren. Grundlage für das immunologische Nachweisverfahren ist eine enzymatische Farbreaktion, die bei stattgefundenener Bindung von Antigen und Antikörper abläuft. Dabei ist die Farbintensität proportional zur Menge des gebundenen Antigens. Für die Arbeit wurde auch der sogenannte Sandwich-ELISA, bei dem zwei Antikörper genutzt werden, verwendet um die Antigene bzw. Zytokine zu bestimmen.

3.6.2.1 CCL17

Zur Messung der Konzentrationen von CCL17 wurde das TARC Human ELISA Kit von ThermoFisher verwendet und bei Raumtemperatur gearbeitet.

Zunächst wurden 100 µl/Well von den vorbereiteten Standardlösungen von CCL17 und 100 µl/Well von den Überständen der behandelten Zellen, 1:100 verdünnt mit Diluent C, auf die 96 Well Platte gegeben. Dann wurde die Platte mit Parafilm bedeckt für 2,5 h inkubiert. Anschließend wurde die Platte mit Wash Buffer, 1:20 verdünnt in deionisiertem Wasser, mehrmals gewaschen. Dann folgte eine einstündige Inkubation mit 100 µl/Well von dem biotinylierten Antikörper, 1:80 verdünnt mit Diluent B. Nach erneutem Waschen mit dem Wash Buffer wurden 100 µl/Well von dem Enzym Streptavidin-HRP hinzugegeben und bei Raumtemperatur für 45 min inkubiert. Danach erfolgte wieder ein Waschschrift und die Inkubation mit 100 µl/Well von dem Chromogen TMB (3,3'-5,5-Tetramethylbenzidin), das HRP als Substrat dient und einen blauen Farbumschlag bewirkt, für 30 min. In einem letzten Schritt wurden dann 50 µl Schwefelsäure als Fixierlösung den Proben hinzugefügt, welche einen Farbwechsel von blau auf gelb bedingt. In diesem Zustand wurde die Platte bei 450 nm Messwellenlänge und 620 nm Referenzwellenlänge in einem TECAN GENios gemessen.

3.6.2.2 IL-6

Gearbeitet wurde mit dem Human IL-6 Uncoated ELISA von ThermoFisher. Im ersten Schritt wurde eine 96 Well Platte mit ebenem Boden mit dem entsprechenden Capture

Methoden

Antibody, der zuvor im Verhältnis 1:250 mit Coating Buffer gemischt wurde und der Immobilisierung von Proteinen bzw. Antikörpern dient, beschichtet und über Nacht mit Parafilm versiegelt und inkubiert. Als Coating Buffer diente PBS 1:10 in deionisiertem Wasser. Für den IL-6 ELISA wurden vom Antikörper 100 µl/Well verwendet.

Am folgenden Tag wurde die Platte gründlich mit PBS und 0,05% Tween als Wash Buffer gewaschen und für eine Stunde mit ELISA/ELISASPOT Diluent, im Verhältnis 1:5 mit deionisiertem Wasser, bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt dient der Reduzierung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Platte, sodass später bei der Messung der „Hintergrund“ von nicht zu messenden Bestandteilen kleiner wird.

Nach einem weiteren Waschschrift mit dem Wash Buffer wurde in einer Titrationsreihe das zu messende und vorbereitete Zytokin IL-6 zur Ermittlung der Eichkurve sowie die Proben auf die Platte gegeben und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit band der haftende Capture Antibody das IL-6, je nachdem wie viel davon vorhanden war.

Nach der Inkubation und erneutem Waschen wurde der Detection Antibody, 1:250 in ELISA/ELISASPOT Diluent gelöst, hinzugegeben. Dieser band ebenfalls das Zytokin, falls es vorhanden war. Nach einer einstündigen Inkubation wurden dann 100 µl von dem Enzym Avidin-HRP für den IL-6 ELISA den Proben hinzugefügt, welches diesen zweiten Antikörper band. Nach 30 min wurde in einem weiteren Schritt das Enzym mit TMB Chromogen versetzt. Dazu wurden 100 µl pro Well verwendet und die Proben für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

In diesem Zustand wurde die Platte bei 450 nm Messwellenlänge und 620 nm Referenzwellenlänge gemessen.

Methoden

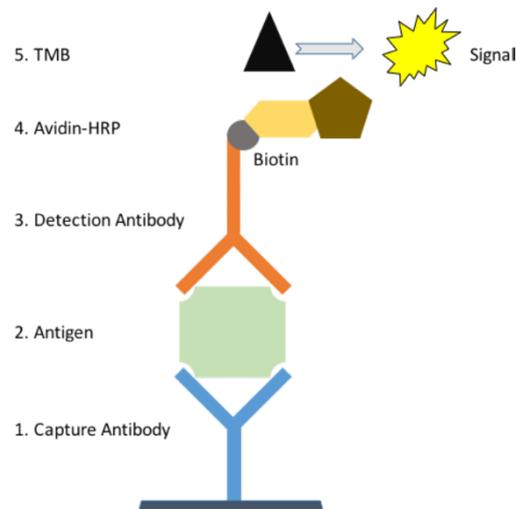


Abbildung 5: Das Prinzip des Sandwich-ELISAs

Zunächst bindet der sog. Capture Antibody am Boden der Platte. Im nächsten Schritt haftet das zugehörige Antigen, falls es in der Lösung vorhanden ist, an diesen ersten Antikörper. Ein zweiter biotinylierter Antikörper, der sogenannte Detection Antibody, bindet dann ebenfalls an dasselbe Antigen. Dieser dient dann als Bindestelle für Avidin-HRP. HRP ist eine Peroxidase, die TMB blau färbt bei einem Absorptionsmaximum bei 650 nm. Schwefelsäure als Fixierlösung führt einen Farbwechsel herbei, sodass sich TMB bei 450nm gelb verfärbt. Anschließend werden die Proben von einem Photometer gelesen.

3.7 Statistik

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde Graphpad Prism 7 verwendet. Bei Experimenten mit mehrfachen Wiederholungen wurde das arithmetische Mittel mit Standardabweichung berechnet. Bei einfachen Experimenten wurde der t-test angewandt. Zum Vergleich der Einflussfaktoren auf die Gruppen und dem Vergleich der Gruppen untereinander wurde die Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit anschließendem Tukey-Test verwendet. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0.05$ angenommen und mit * gekennzeichnet (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

4 Ergebnisse

Die Arbeit vertieft das Verständnis von *in vitro* generierten dendritischen Zellen, die in der Immuntherapie von Tumoren als zelluläre Vakzine genutzt werden. In allen Experimenten wurden humane Monozyten verwendet und der Einfluss von IL-10, TLR-Triggern und PIK-75 auf die Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen phänotypisch und funktionell analysiert. Durch die separate Betrachtung zweier resultierender Populationen aus der Monozytenpopulation wurde die Heterogenität der Zellprodukte differenziert.

4.1 Unreife dendritische Zellen verlieren ihren Monozytenmarker CD14

Kultiviert man Monozyten in IL-4 und GM-CSF, so entwickeln sich nach einigen Tagen unreife dendritische Zellen (iDCs), die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie den für Monozyten charakteristischen Oberflächenmarker CD14 während ihrer Entwicklung verlieren. Hierzu wurden PBMCs vor Beginn der Zellkultur und dann im 24-stündigen Abstand auf ihre CD14-Expression untersucht.

Vor der Kultivierung war ein Großteil der Zellen (85,6%) positiv hinsichtlich dieses Markers und bereits 24 h später wurde eine deutlich verminderte Expression (49,1%) festgestellt. Diese Tendenz zeichnete sich auch nach 48 h (9,6%) und 72 h (9%) ab, sodass die Mehrheit der Zellen an Tag 3 des Versuchs kaum noch den Monozytenmarker CD14 exprimierte, bevor die Zellen den Reifungsstimulus zur weiteren Differenzierung erhielten (Abbildung 6 und Abbildung 7).

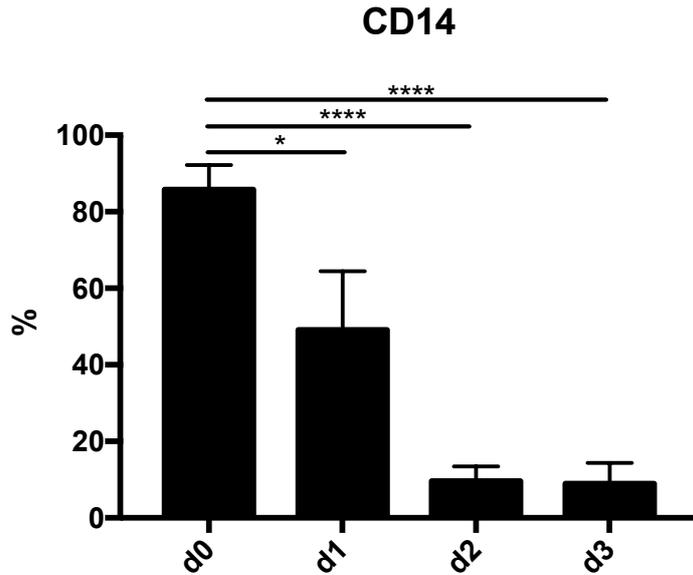


Abbildung 6: Monozyten verlieren während ihrer Entwicklung zu iDCs den Marker CD14
 Dargestellt ist die Expression des Oberflächenmarkers CD14 von Monozyten in Kultur von IL-4 und GM-CSF über 3 Tage (n=3, Mittelwert + SD, *unpaired t-test*).

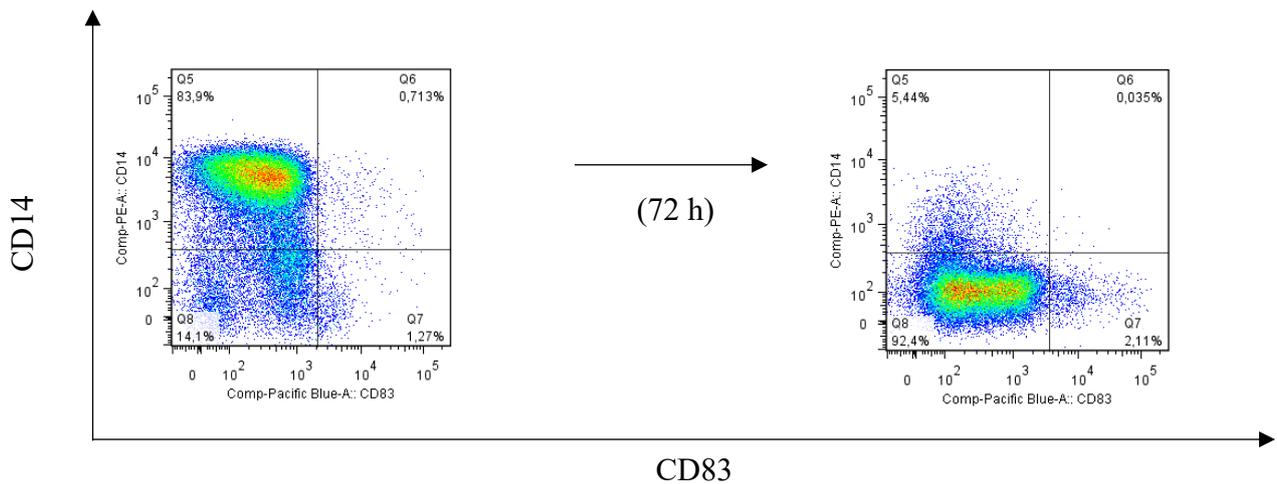


Abbildung 7: Unreife dendritische Zellen exprimieren weniger CD14 als Monozyten
 Monozyten werden 72 h in IL-4 und GM-CSF kultiviert und differenzieren zu unreifen dendritischen Zellen (iDCs), die deutlich weniger CD14 exprimieren. Der Plot zeigt neben der CD14-Expression auch die Expression von CD83. Die Expression von CD83 definiert *in vitro* eine reife dendritische Zelle (mDC).

4.2 CD14-Reexpression

4.2.1 CD14-Reexpression wird durch IL-10 und R848 stimuliert

Wie gezeigt (Abbildung 6 und Abbildung 7) verlieren unreife dendritische Zellen den Oberflächenmarker CD14 während ihrer mehrtägigen Kultur.

Der Marker wurde nach 24-stündiger Stimulation der unreifen dendritischen Zellen erneut gemessen (Abbildung 8). Je nach Stimulus war eine unterschiedlich starke Expression von CD14 festzustellen. Die unstimulierten iDCs (9,2%) zeigten dabei keine Veränderung ihrer Expression im Vergleich zum Vortag. Erfolgte die Inkubation ausschließlich mit IL-10, so war eine Verdreifachung der CD14-positiven Population im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen festzustellen (26,2%). Ebenfalls zeigte sich eine verstärkte Expression nach Stimulation mit dem TLR7/8-Agonisten R848 (14,9%). R848 fungiert als Immunmodulator und reguliert den Reifungs- und Differenzierungsprozess dendritischer Zellen^{81,82}. Erfolgte sowohl eine Inkubation der Zellen mit IL-10 als auch mit R848 eine Stunde später, so war die stärkste CD14-Expression im Vergleich zu den anderen Kulturbedingungen zu beobachten (35,3%). Für weitere Beobachtungen wurden die Zellen, die CD14 exprimierten, als CD14⁺ Population definiert und genauer analysiert.

Die Expression des Oberflächenmarkers CD83, der *in vitro* eine ausgereifte dendritische Zelle definiert, wurde ebenfalls gemessen (Abbildung 8). Dabei zeigte sich, dass iDCs zu einem kleinen Teil ohne Stimulation diesen Marker exprimierten (12%). Unter dem Einfluss von IL-10 blieben diese Zellen für CD83 negativ (4,2%). Bei Stimulation mit dem TLR7/8-Agonisten R848 differenzierten die meisten Zellen zu mDCs aus (63,8%), während die gleichzeitige Stimulation von IL-10 und R848 eine verminderte Ausdifferenzierung zu CD83-positiven Zellen bedingte (28,6%). Die CD83-positiven Zellen wurden als CD83⁺ Population definiert und wie auch die CD14⁺ Population separat analysiert.

Diese beiden Populationen wurden dann in weiteren Experimenten hinsichtlich ihrer Morphologie und Funktionalität gegenübergestellt.

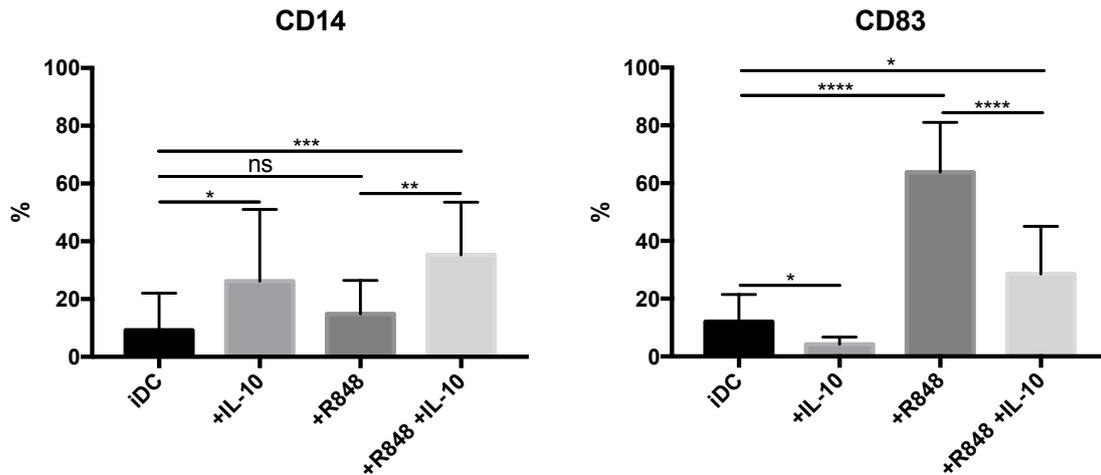


Abbildung 8: Expression von CD83 und CD14 unter IL-10 und/oder R848-Stimulation
iDCs zeigen unter 24-stündiger Stimulation von IL-10, R848 oder beidem eine unterschiedlich starke Expression der Oberflächenmarker CD14 und CD83 (n=13, Mittelwert + SD, ANOVA).

4.2.2 CD14-Reexpression wird durch IL-10 und R848 bei CD14-depletierten Zellen stimuliert

Vor Stimulation mit IL-10 oder R848 war ein kleiner Teil der Zellen CD14-positiv (Abbildung 6). Um auszuschließen, dass die Heraufregulierung von CD14 nach 24 h nur auf die Proliferation dieser Gruppe zurückzuführen war, erfolgte vor einer weiteren Stimulation die Depletion der CD14⁺ Zellen. Die Ausgangspopulation zeigte somit vor der Stimulation keine Expression dieses Markers (Abbildung 9A).

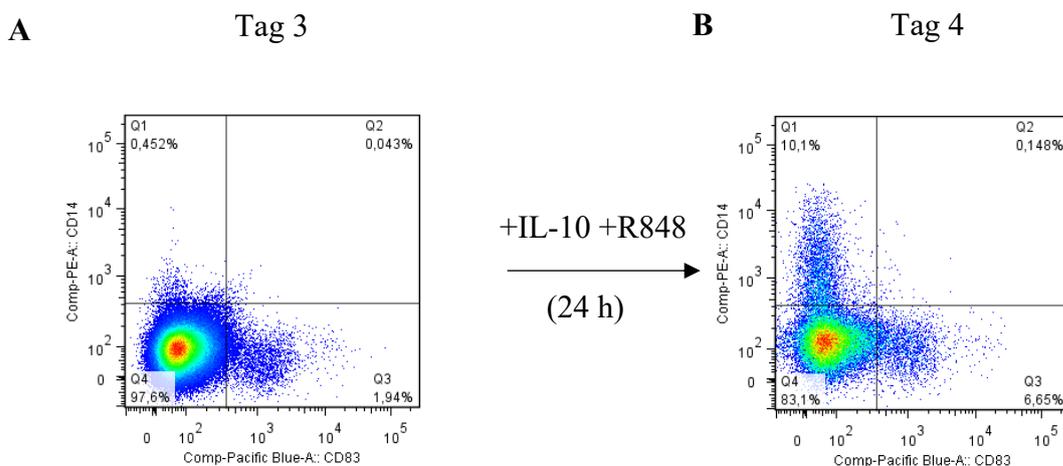


Abbildung 9: Reexpression von CD14 nach IL-10 und R848-Stimulation nach CD14-Depletion
A Unreife dendritische Zellen wurden an Tag 3 CD14-depletiert. **B** CD14-negative Zellen wurden für 24 h mit IL-10 und R848 stimuliert und am FACS hinsichtlich von CD14 und CD83 gemessen. Beispielhafte Darstellung eines Experiments.

Einen Tag nach der Zellstimulation wurde eine unterschiedlich starke Reexpression von CD14 abhängig vom Stimulus sichtbar (Abbildung 9B und Abbildung 10). Ein kleiner Prozentsatz der CD14-depletierten iDCs zeigte eine Expression des Oberflächenmarkers (2,2%). Im Vergleich zu den iDCs war die Expression unter IL-10 (8,3%) und R848-Einfluss (5,4%) erhöht. Wurden die Zellen mit beidem stimuliert, zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) bezüglich der CD14-Expression (17,2%).

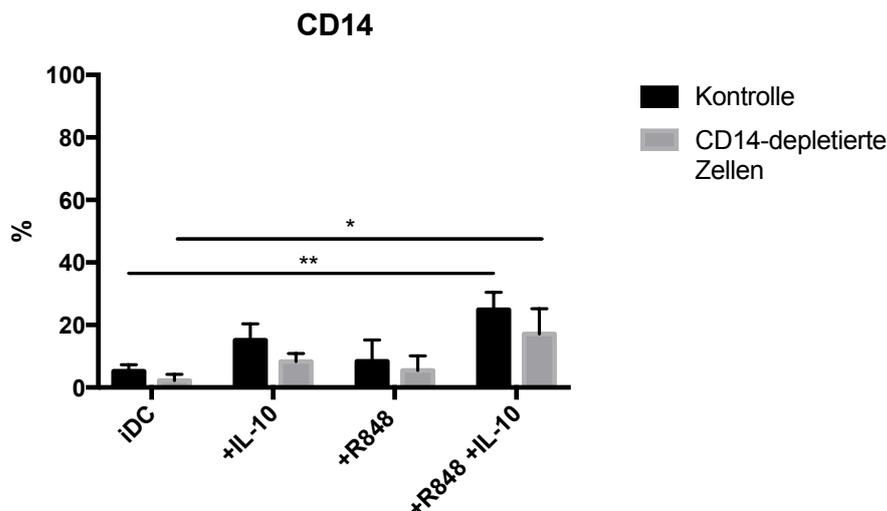


Abbildung 10: CD14-Reexpression nach 24-stündiger Stimulation

iDCs wurden an Tag 3 CD14 depletiert. Wie auch in der Kontrollgruppe der nicht-depletierten Zellen zeigt sich eine unterschiedlich starke Expression von CD14 abhängig vom Stimulus. IL-10- und R848-stimulierte Zellen zeigen im Vergleich zu der nicht stimulierten Gruppe signifikante Unterschiede hinsichtlich der CD14-Expression (n=3, Mittelwert+SD, ANOVA).

4.2.3 R848 allein steigert die CD14-Reexpression leicht

Um den Einfluss von R848 allein, also ohne IL-10-Zugabe, auf die CD14-Expression zu testen, wurden die Zellen in einer Titrationsreihe mit dem TLR-Agonisten stimuliert (Abbildung 11). Dabei korrelierte mit steigender Konzentration eine leicht höhere CD14-Expression. Diese war bei 20 $\mu\text{l/ml}$ R848 (28,5%) im Vergleich zur Ausgangspopulation mit den unstimulierten Zellen (23,5%) am stärksten. Vor allem war bei dieser Konzentration die Variabilität der Versuchsergebnisse deutlich niedriger.

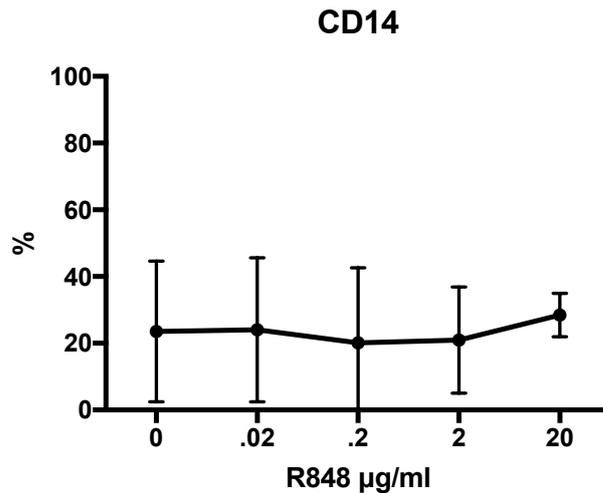


Abbildung 11: Titration mit dem TLR-Agonisten R848

iDCs wurden für 24 h in unterschiedlicher Konzentration mit R848 stimuliert. Bei 20 $\mu\text{l/ml}$ zeigt sich ein leichter Anstieg der CD14-Expression (n=3, Mittelwert +SD).

4.2.4 IL-10 in Kombination mit R848 steigert die CD14-Reexpression stark

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, inwieweit IL-10 die Expression von CD14 fördert. Dazu wurden iDCs in einer Titrationsreihe mit IL-10 inkubiert (Abbildung 12). Des Weiteren wurde alle Zellen 1 h nach IL-10-Präinkubation zusätzlich mit R848 stimuliert, sodass sich insgesamt eine höhere Expression und damit ein größerer Anteil der CD14⁺ Population feststellen ließ, da R848 allein bereits zu einer erhöhten CD14-Expression führte (Abbildung 11).

Mit steigender Konzentration des Zytokins IL-10 war eine höhere Expression des Oberflächenmarkers zu erkennen. Bei einer hohen Konzentration von 40 ng/ml zeigten die Zellen eine hohe Expression (42%) des Markers im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (16,9%), die nur den R848-Stimulus erhielten.

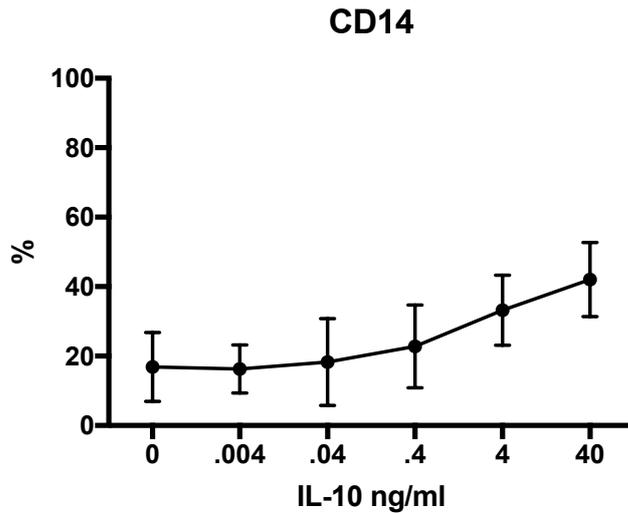


Abbildung 12: Titration mit IL-10

iDCs wurden für 24 h in unterschiedlicher Konzentration mit IL-10 inkubiert. Zusätzlich erhielten alle Zellen 1 h nach erfolgter Inkubation mit IL-10 eine R848-Stimulation. Es zeigt sich mit zunehmender Konzentration eine höhere Expression von CD14 (n=3, Mittelwert +SD).

4.2.5 TNF- α reduziert die CD14-Reexpression

Es ist bekannt, dass der Tumornekrosefaktor *alpha* (TNF- α) die Reifung dendritischer Zellen fördert und pro-inflammatorisch wirkt⁸³.

Hier sollte untersucht werden, inwiefern sich TNF- α auf die Ausdifferenzierung der CD14⁺ Population, die wie bereits gezeigt insbesondere nach IL-10-Inkubation ausdifferenziert, auswirkt. Die Zugabe von TNF- α erfolgte 48 h nach Kultivierungsbeginn in Form einer Präinkubation bereits 24 h vor der weiteren Inkubation mit IL-10 und R848. Dadurch wurde ein pro-inflammatorisches Milieu geschaffen und der Frage nachgegangen, inwiefern diese Präinkubation die untersuchten Zellen bereits in ihren weiteren Differenzierungsprozess beeinflusst und eine Ausdifferenzierung der CD14⁺ Zellpopulation bei IL-10-Inkubation verhindert.

Untersucht wurden unreife dendritische Zellen, die zum einen durch R848 stimuliert wurden und Zellen, die neben R848 zusätzlich IL-10 erhielten. Letztere Kombination führte zu einer deutlich größeren CD14⁺ Population (Abbildung 12).

Die Titration mit TNF- α verdeutlicht, dass eine Zunahme der Konzentration von TNF- α zu einer Abnahme der CD14-Expression führt (Abbildung 13). Ohne Zugabe des Zytokins war bei den R848-gereiften Zellen deutlich eine CD14-Expression festzustellen (15,4%). Diese war bei einer Konzentration von 1 ng/ml TNF- α fast nicht mehr vorhanden (0,4%). Wurden die Zellen zusätzlich mit IL-10 inkubiert, zeigte sich ebenfalls in der TNF- α -präinkubierten Gruppe eine deutliche Reduktion der CD14-Expression.

Ergebnisse

Durch Stimulation mit 10 ng/ml TNF- α sank der Anteil der CD14-exprimierenden Zellen (9,9%) signifikant im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle (47,3%).

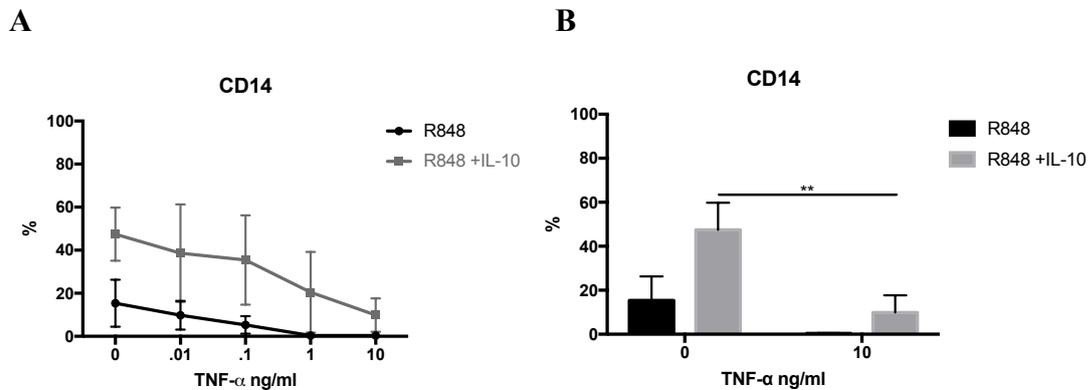


Abbildung 13: Titration mit TNF- α

Geringe Mengen von TNF- α hemmen die Entwicklung einer CD14⁺ Population signifikant. Die Zellen wurde 24 h vor Zugabe von R848 und IL-10 mit TNF- α präinkubiert (**A+B** n=3, Mittelwert +SD, **B** ANOVA).

4.2.6 PGE₂ verstärkt die CD14-Reexpression

Da das Prostaglandin E₂ das Immunsystem hemmen und anti-inflammatorisch wirken kann, wurde untersucht, welche Effekte das Prostaglandin auf die CD14-Expression der Zellen hat. Die Stimulation mit PGE₂ erfolgte in einer Titrationsreihe analog zur Versuchsreihe der TNF- α -Präinkubation und wurde 24 h vor weiteren Reifungsstimuli gegeben (Abbildung 14). Als weiterer Reifungsstimulus wurde R848 allein oder in Kombination mit IL-10 gegeben.

R848-stimulierte Zellen zeigten mit zusätzlicher PGE₂-Stimulation in hoher Konzentration von 1 μ g/ml eine deutlich erhöhte CD14-Expression (26,9%) im Vergleich zur Kontrolle (12,8%). Wurden die Zellen zusätzlich mit IL-10 behandelt, zeigte sich der gleiche Effekt, sodass bei einer Konzentration von 1 μ g/ml PGE₂ der Anteil der CD14-exprimierenden Zellen (67,5%) höher war als ohne PGE₂-Präinkubation (49,1%).

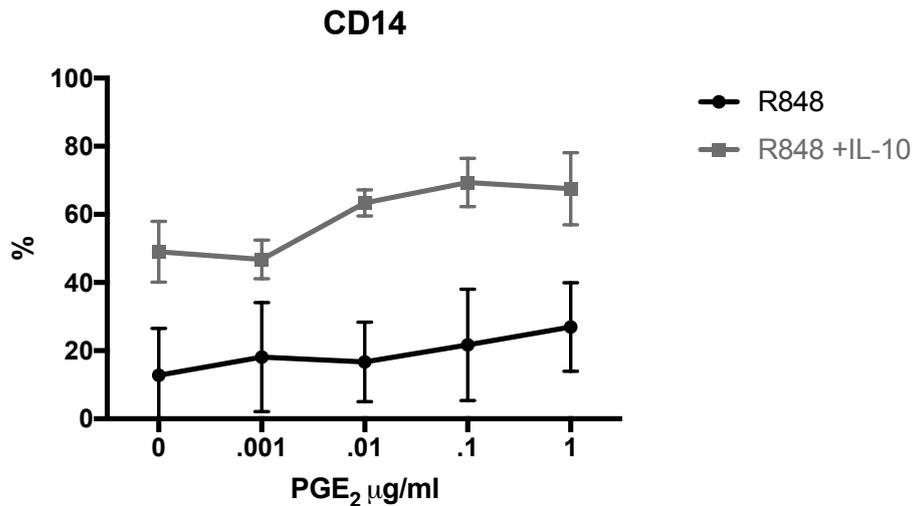


Abbildung 14: Titration mit PGE₂

Hohe Konzentrationen von PGE₂ fördern die Entwicklung einer CD14⁺ Population. Die Zellen wurde 24 h vor Zugabe von R848 und IL-10 mit PGE₂ inkubiert (n=3, Mittelwert + SD).

4.2.7 IL-4 und GM-CSF haben keinen Einfluss auf die CD14-Reexpression

Um Monozyten zu iDCs ausreifen zu lassen, erhielten die Zellen in Zellkultur IL-4 und GM-CSF. Dabei ist die Überlegung, dass IL-4 die Entwicklung zu Makrophagen unterbinden soll, während GM-CSF die Differenzierung zu dendritischen Zellen fördert. Um festzustellen, inwiefern die Konzentration beider Zytokine einen Einfluss auf die Expression von CD14 hat, wurden die Konzentrationen jeweils im Vergleich zu der Standarddosis erhöht (Abbildung 15). Die zehnfache Zugabe von IL-4 (1000 U/ml statt 100 U/ml) und GM-CSF (8000 U/ml statt 800 U/ml) erfolgte bereits an Tag 1 nach Kulturstart und an Tag 3 am Tag der Stimulation. Als Reifungsstimuli wurden entweder LPS, R848 oder die Kombination aus PGE₂, TNF- α und IL1- β eingesetzt. Zusätzlich erhielten die Zellen IL-10, sodass die CD14-Expression insgesamt gefördert wurde. Es wurde nun getestet, ob IL-4 und GM-CSF einen Einfluss auf die von IL-10 bedingte Heraufregulierung von CD14 haben.

Wie bereits gezeigt wurde, war nach R848-Stimulation der Anteil der Zellen, die CD14 exprimierten, bei zusätzlicher IL-10-Gabe deutlich höher (71%) als ohne IL-10 (11,7%). Dieser Anteil änderte sich nicht wesentlich, wenn entweder die Konzentration von GM-CSF erhöht wurde (71,7%) oder IL-4 in höherer Konzentration gegeben wurde (73,4%). Wurde statt R848 ein anderer TLR-Stimulus wie LPS gegeben, war ein ähnlicher Effekt zu beobachten. IL-10 erhöhte den CD14-Anteil der LPS-stimulierten Zellen (68,3%). Weder eine höhere Konzentration von GM-CSF (69,7%), noch von IL-4 (69,7%) beeinflussten die Heraufregulierung wesentlich im Vergleich zu der nicht mit IL-10

Ergebnisse

behandelten Zellpopulation. Auch Zellen, die unter dem Zytokinmix PGE₂, IL1- β und TNF- α reiften, zeigten ein ähnliches Bild. IL-10 erhöhte den Anteil der CD14-exprimierenden Zellen (43%) in ähnlichem Ausmaß wie unter zusätzlich höherer GM-CSF- (45,6%) oder IL-4-Konzentration (44,4%) im Vergleich zu den alleinig unter dem Zytokinmix gereiften Zellen (3,7%).

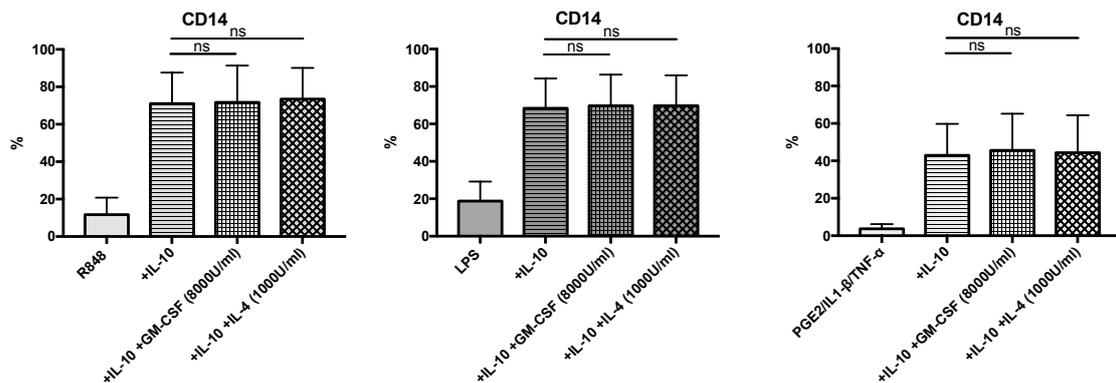


Abbildung 15: Hohe Konzentration von IL-4 oder GM-CSF haben keinen Einfluss auf die CD14-Expression bei IL-10-Inkubation

Humane Monozyten wurden mit der zehnfachen Dosierung von IL-4 (1000 U/ml) und GM-CSF (8000 U/ml) nach 24 h und 72 h behandelt und an Tag 3 zusätzlich stimuliert. Unter dem Einfluss hoher Dosierungen zeigt sich kein Unterschied (ns) in der Expression von CD14 im Vergleich zu den Zellen bei Standarddosierungen (n=3, Mittelwert + SD, ANOVA).

4.2.8 Eine siebentägige Inkubationsdauer hat keinen zusätzlichen Einfluss auf die CD14-Reexpression

In allen bisherigen Experimenten wurde die CD14-Expression bei Zellen gemessen, die über vier Tage ausreifen, also nach drei Tagen (72 h) einen 24-stündigen Reifungsstimulus erhielten. Es sollte getestet werden, inwiefern bei längerer Kulturdauer die Heraufregulierung von CD14 erfolgt. Dazu wurden die Zellen nach drei Tagen für weitere drei Tage in Kultur mit IL-4 und GM-CSF belassen, sodass iDCs insgesamt sechs Tage (144 h) heranreifen. Dann wurden die Zellen mit den Reifungsstimuli für 24 h aktiviert (Abbildung 16).

Unstimulierte iDCs exprimierten auch nach sieben Tagen geringfügig CD14 (10,7%). Reiften diese unter IL-10-Inkubation, so erhöhte sich dieser Anteil (21,8%). Eine alleinige R848-Stimulation bewirkte keine Heraufregulierung (10,7%), während die kombinierte Gabe von R848 und IL-10 die Expression signifikant verstärkte (29,7%).

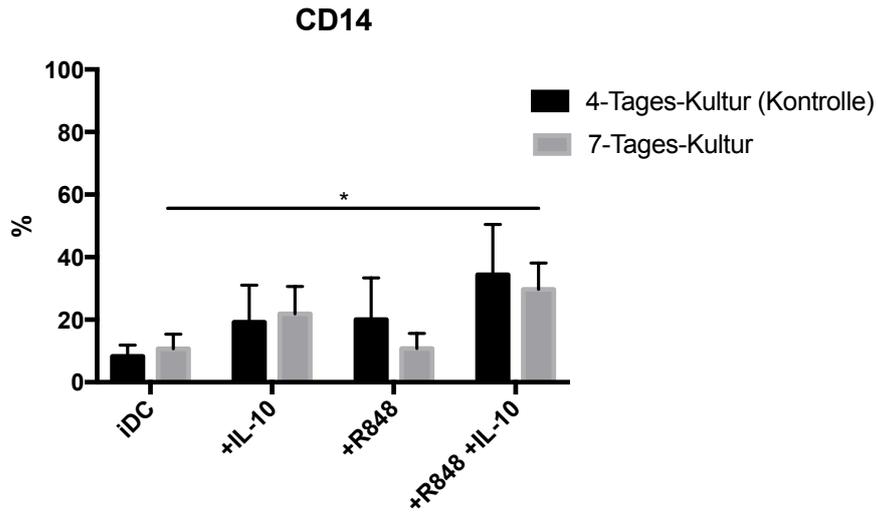


Abbildung 16: 7-Tages-Kultur

Humane Monozyten wurden sechs Tage zu iDCs ausdifferenziert bevor sie den 24-stündigen Reifungsstimulus erhielten. Stimulation mit R848 und IL-10 erhöht die CD14-Expression signifikant (n=3, Mittelwert +SD, ANOVA).

4.3 Zwei Zellpopulationen: CD14⁺- und CD83⁺-Population

Um die stimulierten Zellen genauer zu analysieren, wurden diese in Subpopulationen aufgeteilt. Dazu wurden *gates* auf die CD14⁺ Population und die CD83⁺ Population gesetzt. Es wurde untersucht, welchen Einfluss die Stimulation bzw. Inkubation auf die einzelnen Subpopulationen hat und wie sich die Subpopulationen unter diesem Einfluss voneinander unterscheiden.

Als Stimuli wurden das Zytokin IL-10 oder der TLR-Agonist R848 oder deren Kombination eingesetzt und zunächst beobachtet, wie sich alle Zellen unter diesem Einfluss verändern. Dann wurden die CD14⁺ und die CD83⁺ Subpopulation unter diesem Einfluss genauer betrachtet (Abbildung 17). Dabei wurde die CD83⁺ Population als mDCs definiert, während die CD14⁺ Population neu definiert werden sollte. Gemessen wurde die MFI verschiedener Oberflächenantigene.

Zur Modulation dieser Subpopulationen wurden TNF- α und PGE₂ eingesetzt. Des Weiteren wurde der Einfluss einer längeren Inkubationsdauer von 7 Tagen sowie der Einfluss höherer Konzentrationen von GM-CSF und IL-4 auf die Zellen analysiert.

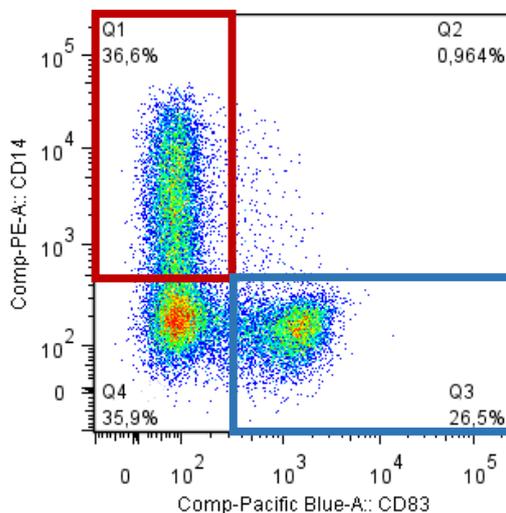


Abbildung 17: Gates von CD14⁺ und CD83⁺ Population

Zur Analyse der Zellen wurden *gates* gesetzt, die eine CD14⁺ Population und eine CD83⁺ Population definieren. Dargestellt sind Zellen, die nach 72-stündiger Differenzierung zu iDCs für weitere 24 h mit R848 und IL-10 inkubiert wurden.

4.3.1 IL-10 reduziert nicht die Expression kostimulierender Oberflächenmarker auf CD83⁺ mDCs

Im Folgenden wurden die beiden Subpopulationen miteinander verglichen und gezeigt, welchen Einfluss neben einer TLR-Stimulation durch R848 auch das Zytokin IL-10 hat, das in der Literatur dafür bekannt ist, die Differenzierung von iDCs zu tolerogenen DCs, bzw. einer Subpopulation namentlich DC-10, anzuregen^{39,57,84}. Da R848 die endogene IL-10-Produktion stimuliert, wird zwischen endogenen Effekten und exogenem IL-10 unterschieden.

Unreife Zellen können bei TLR-Stimulation zu reifen Zellen differenzieren. In einer ersten Versuchsreihe sollte gezeigt werden, welchen Einfluss der TLR7/8-Agonist R848 auf iDCs hat. Dazu wurden iDCs an Tag 3 nach Kulturbeginn für 24 h in einer Titrationsreihe mit dem TLR7/8-Agonisten R848 stimuliert. R848 wurde in den Konzentrationen von 0; 0,02; 0,2; 2 und 20 µl/ml verwendet (Abbildung 18A und Abbildung 19A).

Hier zeigte sich vor allem, dass kostimulierende Moleküle aus der B7- und B2-Familie (CD80, CD86, CD273, CD274 und ILT4) durch R848 insgesamt hochreguliert wurden (Abbildung 18A). Separat analysiert zeigte die CD83⁺ Zellpopulation interessanterweise bereits ohne R848-Stimulation eine hohe CD86-Expression, die durch den zusätzlichen Stimulus nicht verändert wurde.

Neben einer R848-Stimulation wurden in einer weiteren Versuchsreihe die Zellen mit dem Zytokin IL-10 behandelt. Dazu wurden iDCs eine Stunde vor R848-Stimulation (20 µg/ml) in unterschiedlich hoher Konzentration mit IL-10 inkubiert (0; 0,004; 0,04; 0,4; 4 und 40 ng/ml) (Abbildung 18B und Abbildung 19B).

Betrachtet man die gesamte Zellpopulation, so ist zu erkennen, dass das kostimulierende B7-Molekül CD86, das bei der Antigenpräsentation und T-Zell-Proliferation eine tragende Rolle spielt, mit steigender IL-10-Konzentration herunterreguliert wurde. Interessanterweise wurde die Expression von CD86 auf beiden Subpopulationen durch die zusätzliche Gabe von IL-10 aber nicht beeinflusst, anders als es die Betrachtung aller Zellen annehmen würde. CD83⁺ mDCs exprimierten auch unter exogenem IL-10-Einfluss CD86 hoch, während die CD14⁺ Population diesen Rezeptor, unabhängig von exogenem IL-10, generell in geringerer Intensität exprimierte.

Ergebnisse

Ein ähnlicher Effekt zeigte sich bei dem Oberflächenantigen ILT4, das die Immuntoleranz fördert. IL-10 steigerte insgesamt die MFI von ILT4, wenn man alle Zellen betrachtet, hatte aber selbst kaum einen regulatorischen Einfluss auf die beiden Subpopulationen hinsichtlich ihrer ILT4-Expression, die unabhängig von IL-10 hoch bzw. niedrig exprimiert wurde. Die CD14⁺ Population exprimiert signifikant höher den immunsupprimierenden Oberflächenrezeptor ILT4 als mDCs.

Die bereits gezeigten Versuche zeigen, dass IL-10 eine Verschiebung der Populationen mit einem höheren Anteil der CD14⁺ Zellen bewirkt. Folglich sinkt der Anteil der CD83⁺ Zellen, die CD86 exprimieren und dadurch auch die CD86-Expression auf die Gesamtheit aller Zellen betrachtet. Umgekehrt steigt der Anteil der CD14-exprimierenden Zellen, die ILT4 exprimieren und somit auch die ILT4-Expression insgesamt.

Das kostimulierende B7-Molekül CD80 wurde insgesamt leicht herunterreguliert, was sich auf beiden Zellpopulationen widerspiegelte. Sowohl die CD14⁺ Population als auch die CD83⁺ Population exprimierten diesen Marker ähnlich hoch.

CD273 (PD-L2) und CD274 (PD-L1), ebenfalls B7-Moleküle, aktivieren als Liganden für PD-1 T-Zellen. CD273 wurde auf beiden Subpopulationen gleich hoch exprimiert, wobei IL-10 den Rezeptor auf beiden Zellpopulationen leicht hochregulierte. CD274 hingegen wurde signifikant höher von der CD14⁺ Population gebildet. Dieser Unterschied im Vergleich der beiden Populationen wurde durch IL-10 nur leicht gesteigert.

Generell erkennt man, dass IL-10 keinen wesentlichen Einfluss auf die Expression der kostimulierenden Moleküle CD80, CD86, CD273, CD274 und ILT4 auf den beiden Subpopulationen selbst hatte, auch wenn IL-10 die Gesamt-MFI aller Zellen von CD86, CD274 und ILT4 signifikant veränderte (Abbildung 18C). Dieser Effekt ist bedingt durch eine Verschiebung der beiden Populationen, wobei IL-10 die Ausbildung einer CD14⁺ Zellpopulation fördert und der Anteil der CD83⁺ mDCs abnimmt. Folglich sinkt die Gesamt-MFI von CD86 respektive steigt die Gesamt-MFI von CD274 und ILT4.

Ergebnisse

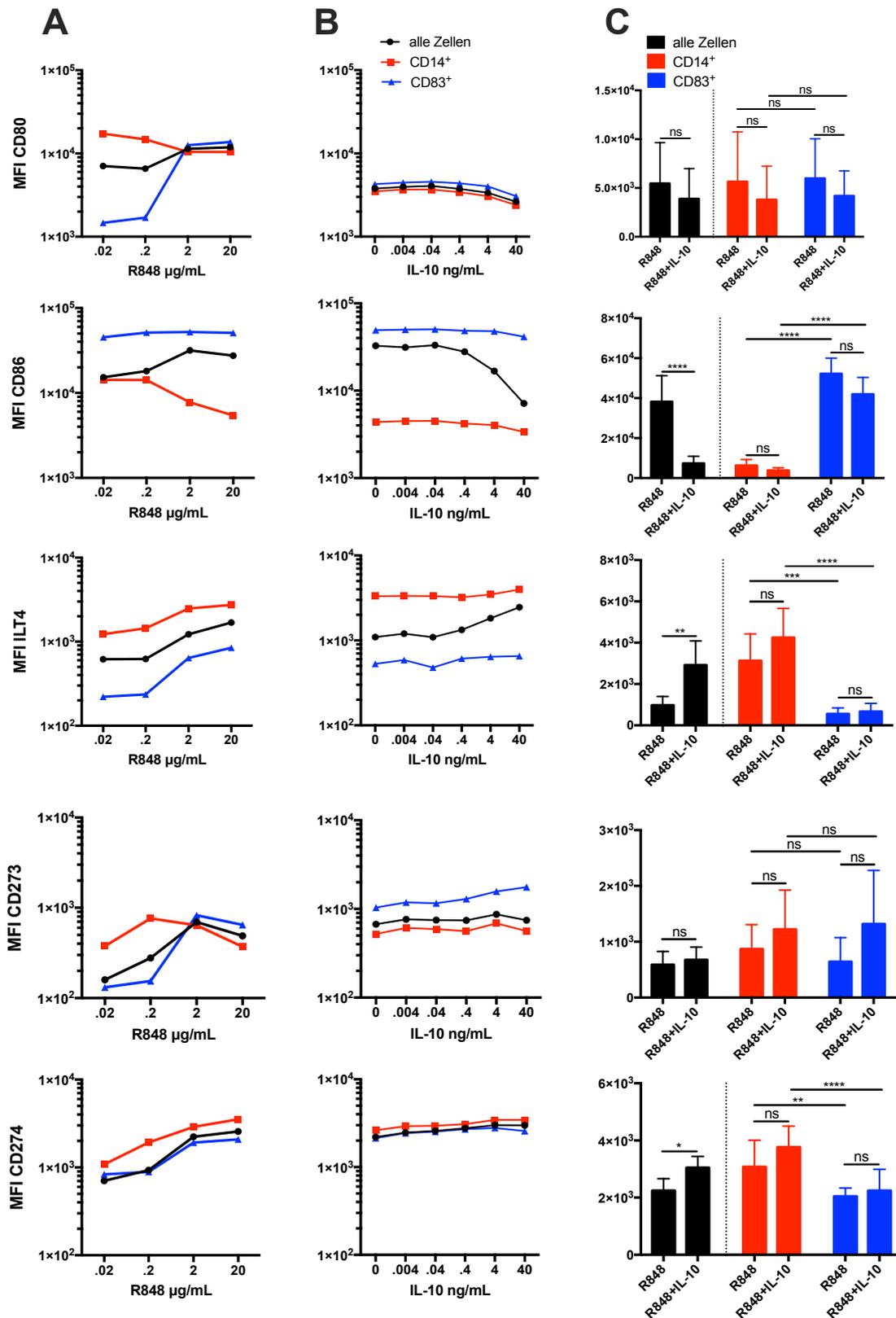


Abbildung 18: Antigenexpression von B7- und B2-Molekülen

Dargestellt ist die Expression in MFI der kostimulierenden Oberflächenmarker CD80 und CD86 sowie der immunregulatorischen Oberflächenmarker ILT4, CD273 und CD274. **A** iDCs nach 24-stündiger Inkubation mit R848 (n=3). **B** R848-stimulierte Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit IL-10 (n=3). **C** Vergleich von **A** und **B** bei R848 von 20 µg/ml und IL-10 von 40 ng/ml (n=8, Mittelwert + SD, ANOVA).

4.3.2 IL-10 fördert eine immunmodulatorische CD14⁺ Population: M2c-like Makrophagen

Des Weiteren wurde der Einfluss von R848 und IL-10 auf die Makrophagenmarker CD36, CD91, CD163, CD204, CD206 und CX₃CR₁ untersucht.

Nach alleiniger R848-Stimulation wurden alle Oberflächenantigene - abgesehen von dem *macrophage scavenger receptor* CD204 - insgesamt betrachtet niedriger exprimiert (Abbildung 19A).

Umgekehrt wurden alle Marker - abgesehen von CD204 - bei steigender IL-10-Konzentration, insgesamt gesehen, höher exprimiert (Abbildung 19B). Wenn man die beiden Populationen separat analysiert, blieb die Markerexpression auf den CD83⁺ mDCs allerdings unbeeinflusst.

Auf der CD14⁺ Population hingegen war die Expression des *mannose receptors* CD206 und des *scavenger receptors* CD163 nicht nur im Vergleich zu den CD83⁺ mDCs erhöht, sondern wurde bei zusätzlicher IL-10-Inkubation sowohl bei CD206 leicht als auch bei CD163 deutlich erhöht, sodass hier ein dosisabhängiger, qualitativer Effekt von IL-10 beobachtet wurde (Abbildung 19C). Alle anderen Marker (CD36, CD91, CD204, CX₃CR₁) blieben auf dieser Population weitestgehend unbeeinflusst. Es zeigt sich, dass IL-10 zwar auf die gesamte Population einen großen Einfluss haben kann, auf die beiden Subpopulationen aber eher geringe Effekte hat. Dies erklärt sich, wie auch bei CD86 und ILT4, durch die Verschiebung der beiden Populationen. Durch die vermehrte Ausbildung der CD14⁺ Population bei IL-10-Inkubation steigt die Expression der Makrophagenmarker insgesamt ohne dabei in der Regel einen direkten Einfluss auf die Markerexpression der einzelnen Populationen zu nehmen. Nur CD163 und in geringem Maß CD206 zeigen eine vermehrte dosisabhängige Expression auf der CD14⁺ Zellpopulation.

Damit lassen sich diese Zellen als CD14⁺CD36⁺CD91⁺CD163⁺CD206⁺CX₃CR₁⁺ Population in Abgrenzung zu den CD83⁺ mDCs definieren.

Ergebnisse

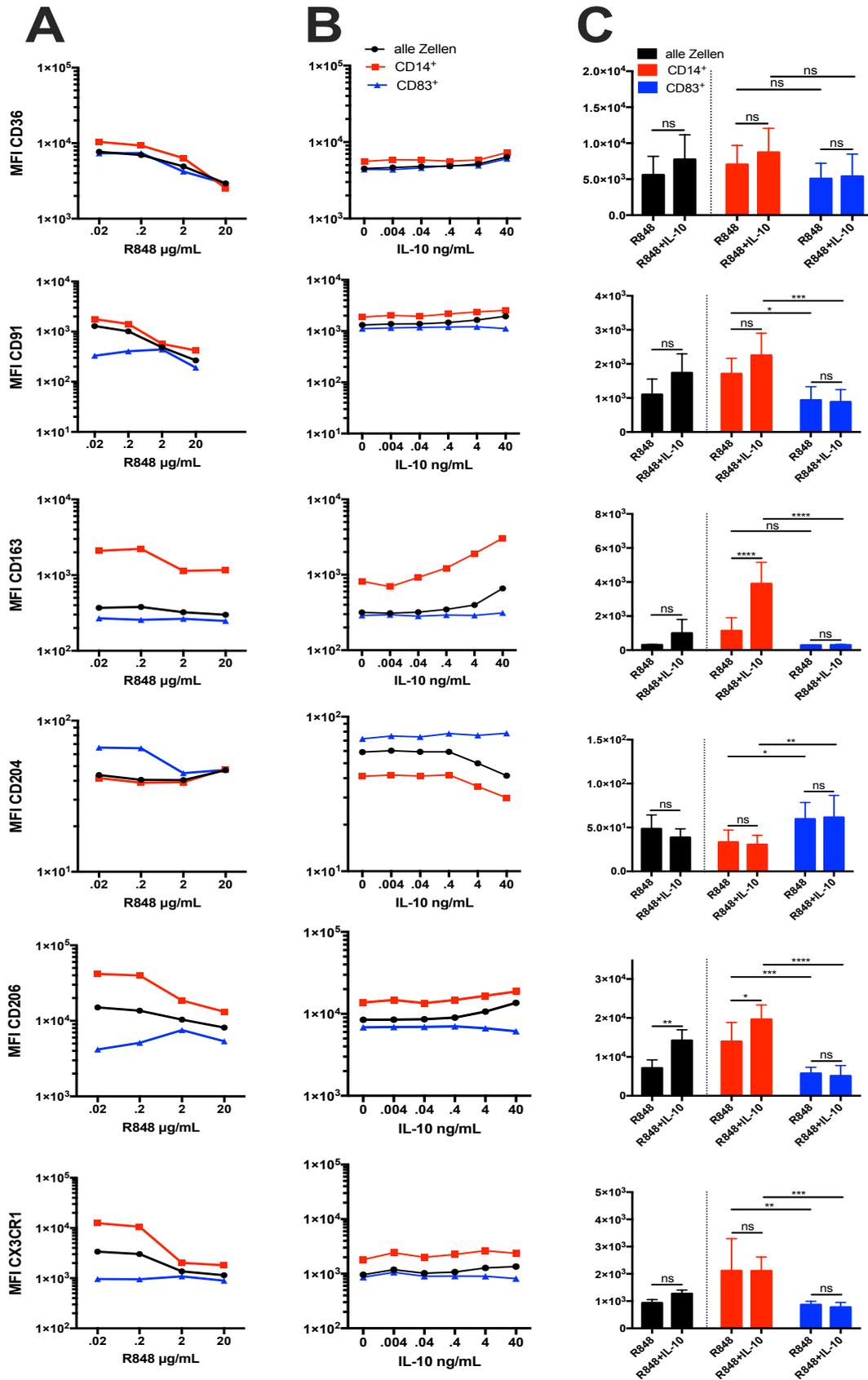


Abbildung 19: Antigenexpression von Makrophagenmarkern

Dargestellt ist die Expression in MFI der kostimulierenden Oberflächenmarker CD36, CD91, CD163, CD204, CD206 sowie CX₃CR₁. **A** iDCs nach 24-stündiger Inkubation mit R848 (n=3). **B** R848-stimulierte Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit IL-10 (n=3). **C** Vergleich von **A** und **B** bei R848 von 20 $\mu\text{g/mL}$ und IL-10 von 40 ng/ml (n=8, Mittelwert + SD, ANOVA).

4.3.3 TNF- α - oder PGE₂-Präinkubation beeinflussen nicht die Differenzierung von CD83⁺ mDCs durch exogenes IL-10

Es wurde untersucht, inwiefern eine zusätzliche TNF- α - oder PGE₂-Stimulation den Phänotyp von Monozyten-gereiften Zellen bzw. der CD14⁺ und CD83⁺ Population verändert und Einfluss auf die weitere Inkubation mit IL-10 nimmt. Das Zytokin TNF- α hat eine tragende Rolle in Inflammationsprozessen, sodass hier die Überlegung war die Zellen durch ein pro-inflammatorisches Milieu vor weiterer Ausdifferenzierung bereits in ihrem Differenzierungsprozess zu beeinflussen. Neben einer R848- und IL-10-Inkubation wurden die Zellen zusätzlich 24 h zuvor mit TNF- α in unterschiedlichen Konzentrationen präinkubiert (Abbildung 20A und Abbildung 21A). Analog zu der Versuchsreihe mit TNF- α wurden die Zellen in einer anderen Versuchsreihe ebenfalls 24 h vor weiterer Stimulation mit PGE₂ präinkubiert und der Einfluss auf die weitere Differenzierung analysiert (Abbildung 20B und Abbildung 21B). Das Prostaglandin E₂ hat im Reifungsprozess von mo-DCs pleiotrope Effekte, die sowohl immunogen als auch tolerogen sein können.

Betrachtet man die CD83⁺ Population, so regulierte das pro-inflammatorische Zytokin TNF- α den kostimulierenden Marker CD80 auf den ausschließlich R848-gereiften mDCs etwas herunter, während CD86 unbeeinflusst blieb. Wurden die Zellen zusätzlich mit IL-10 inkubiert, hatte TNF- α keinen zusätzlichen Einfluss auf deren Expression und CD83⁺ mDCs exprimierten mit oder ohne IL-10 bei einer TNF- α -Konzentration von 10 ng/ml CD80 und CD86 gleich hoch. Die PD-1-Liganden CD273 und CD274 blieben ebenfalls unbeeinflusst. Der Rezeptor ILT4, der die Immunantwort inhibiert, wurde durch die Inkubation mit TNF- α insgesamt weniger exprimiert. Dabei war es ohne Relevanz, ob die Zellen eine weitere Inkubation mit IL-10 erhielten oder nicht.

Die Expression dieser Marker unter dem Einfluss von TNF- α wurde auch auf der CD14⁺ Population analysiert. Wie bereits beschrieben, blockierte das Zytokin die Ausbildung der CD14⁺ Population. Der kleine verbleibende Anteil der Zellen, der unter TNF- α CD14⁺ exprimierte, zeigte eine geringe Expression des kostimulierenden Moleküls CD80 sowohl bei den Zellen ohne IL-10-Inkubation als auch mit IL-10-Inkubation. Insgesamt konnte man aber keine starken Veränderungen der Expression der beschriebenen Marker bei steigender TNF- α -Konzentration und auch keinen Einfluss auf die weitere IL-10-Inkubation feststellen.

Ergebnisse

Unter PGE₂-Einfluss zeigten R848-gereifte CD83⁺ mDCs eine vermehrte Expression von CD80, CD86, CD273 und ILT4. Bei zusätzlicher IL-10-Inkubation wurden diese Marker ebenfalls vermehrt exprimiert. Zusätzlich ließ sich ein leichter Anstieg von CD274 beobachten.

Auch die CD14⁺ Population exprimiert nach PGE₂-Inkubation die B7-Moleküle CD80 und CD86 höher. Der PD-Ligand 1 CD274 wurde interessanterweise bei R848-stimulierten CD14⁺ Zellen unter alleinigem PGE₂-Einfluss weniger gebildet, während diese Population bei zusätzlicher IL-10-Gabe stabil blieb und diese Herunterregulierung verhinderte.

Ergebnisse

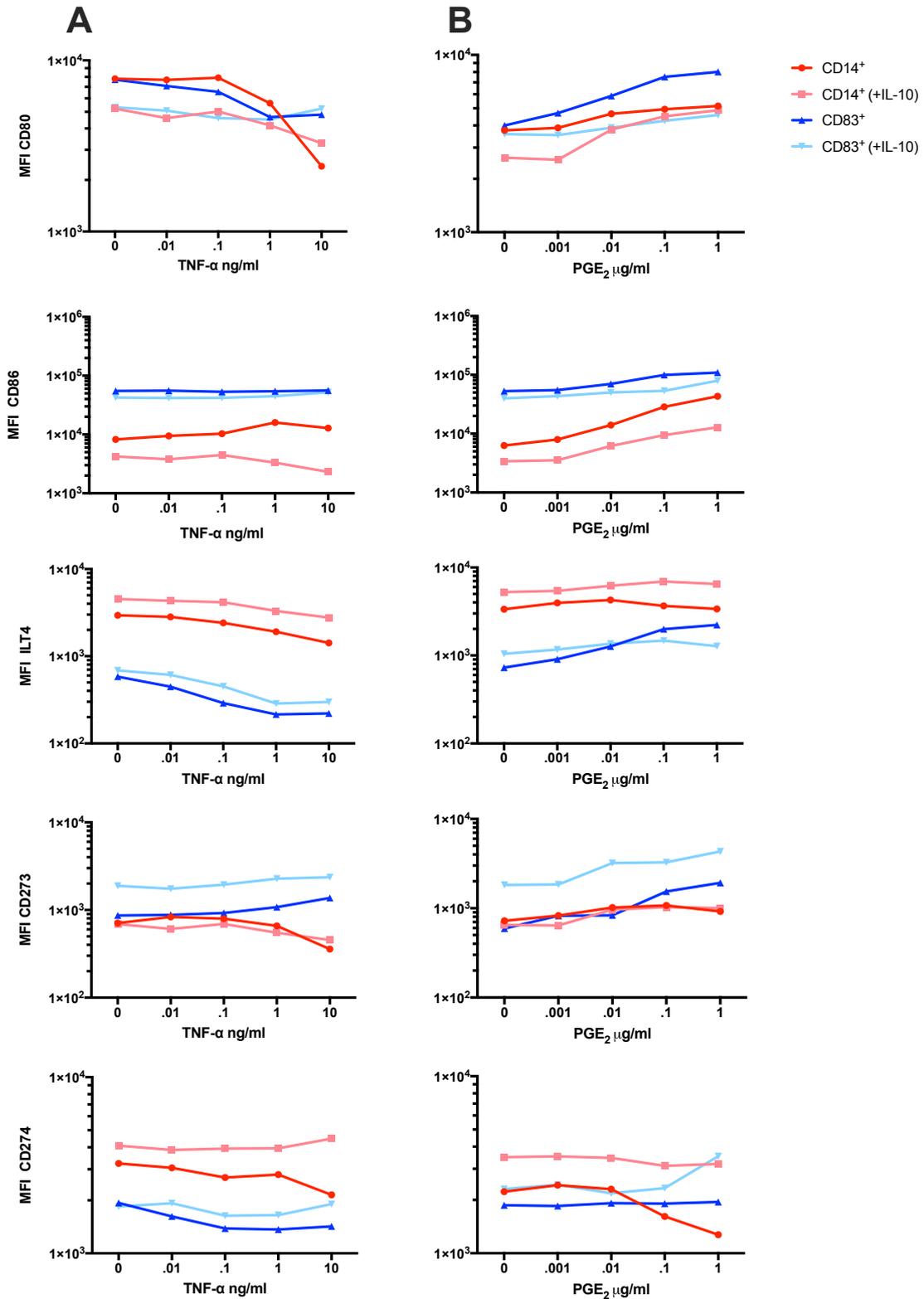


Abbildung 20: Antigenexpression von B7- und B2-Molekülen bei TNF- α - oder PGE₂-Präinkubation
 Dargestellt ist die Expression in MFI der kostimulierenden Oberflächenmarker CD80 und CD86 sowie der immunregulatorischen Oberflächenmarker ILT4, CD273 und CD274. **A** iDCs wurden 24 h vor Stimulation mit R848 oder R848/IL-10 mit TNF- α präinkubiert. **B** iDCs wurden 24 h vor Stimulation mit R848 oder R848/IL-10 mit PGE₂ präinkubiert.

4.3.4 TNF- α - oder PGE₂-Präinkubation beeinflussen nicht die Differenzierung von CD14⁺ M2c-like Makrophagen durch exogenes IL-10

Es wurde analysiert, inwiefern eine TNF- α - oder PGE₂-Präinkubation Auswirkungen auf die Differenzierung der M2c-like Makrophagen durch IL-10 hat. Dazu wurden die entsprechenden Makrophagenmarker CD36, CD91, CD163, CD204, CD206 und CX₃CR₁ gemessen (Abbildung 21).

Betrachtet man die Makrophagenmarker zunächst auf CD83⁺ mDCs, zeigte sich lediglich eine Herunterregulierung von CD36 durch TNF- α , während die anderen Marker CD91, CD163, CD204, CD206 und CX₃CR₁ nicht reguliert wurden. Dies war unabhängig von einer weiteren IL-10-Inkubation.

Ein ähnliches Bild war bei der CD14⁺ Population zu beobachten, die durch TNF- α mit und ohne IL-10 hinsichtlich ihrer Makrophagenmarker-Expression in gleicher Weise beeinflusst wurde. Auffällig bei der CD14⁺ Population war vor allem eine verminderte Expression von CD163 bei steigender TNF- α -Konzentration, die sowohl auf den R848-gereiften Zellen mit IL-10-Inkubation als auch ohne IL-10-Inkubation zu beobachten war. Zusätzlich blockierte TNF- α die Expression von CD36 und CX₃CR₁ auf dieser Zellpopulation. Der *macrophage scavenger receptor* CD204 wurde durch den pro-inflammatorischen Zytokin-Einfluss vermehrt exprimiert.

Unter PGE₂-Einfluss exprimierten die CD83⁺ mDCs geringer den Phagozytose-Rezeptor CD36, den Mannose-Rezeptor CD206 als auch den Oberflächenmarker CD91, wobei dieser Effekt bei zusätzlicher IL-10-Inkubation etwas ausgeprägter war. Die weiteren Makrophagenmarker CD163, CD204 und CX₃CR₁ blieben unverändert.

Auf der CD14⁺ Population zeigte sich ein ähnliches Bild wie nach der TNF- α -Inkubation. Die Makrophagenmarker blieben weitestgehend unbeeinflusst. Lediglich CD204 wurde durch die zusätzliche PGE₂-Inkubation unabhängig von IL-10 heraufreguliert.

Insgesamt hat weder TNF- α noch PGE₂ eine Auswirkung auf den Phänotyp bei zusätzlicher IL-10-Inkubation im Vergleich zu den allein unter R848 ausdifferenzierten Zellen und es zeigt sich ein stabiler Phänotyp der M2c-like Makrophagen, die aber wie die Versuche zuvor gezeigt haben unter TNF- α quantitativ weniger und unter PGE₂-Inkubation quantitativ mehr gebildet werden.

Ergebnisse

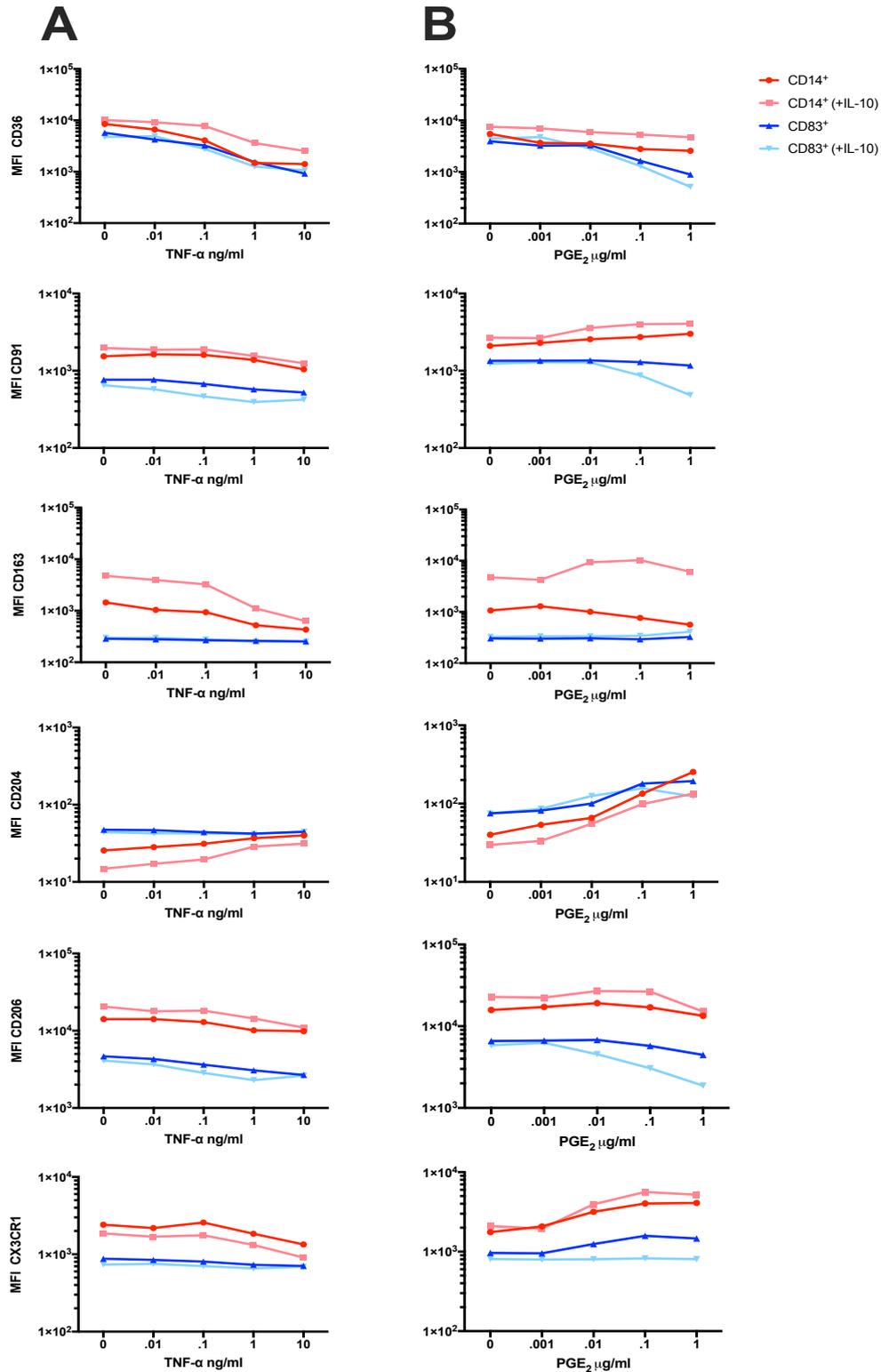


Abbildung 21: Antigenexpression von Makrophagenmarkern bei TNF- α - oder PGE₂-Präinkubation

Dargestellt ist die Expression in MFI der kostimulierenden Oberflächenmarker CD36, CD91, CD163, CD204, CD206 sowie CX₃CR₁. **A** iDCs wurden 24 h vor Stimulation mit R848 oder R848/IL-10 mit TNF- α präinkubiert. **B** iDCs wurden 24 h vor Stimulation mit R848 oder R848/IL-10 mit PGE₂ präinkubiert.

4.4 M2c-Makrophagen zeigen einen stabilen Phänotyp

4.4.1 IL-4 und GM-CSF in höherer Konzentration haben keinen Einfluss auf den M2c-like Makrophagen Phänotyp

Wie gezeigt bildet sich unter R848- und IL-10-Inkubation neben mDCs eine neue CD14⁺CD36⁺CD91⁺CD163⁺CD206⁺CX₃CR₁⁺ Population. Es wurde untersucht, welchen Einfluss neben R848 und IL-10 die Zytokine IL-4 und GM-CSF auf die Ausbildung dieser Population haben (Abbildung 22). Die Zellen wurden in jeweils zehnfacher Konzentration dieser beiden Zytokine kultiviert. Die weitere Inkubation erfolgte mit R848 mit zuvor erfolgter Präinkubation mit IL-10. Dabei zeigte sich bei allen gemessenen Oberflächenantigenen keine unterschiedliche Expression der Marker bei unterschiedlicher Konzentration von IL-4 oder GM-CSF, sodass der Phänotyp der CD14⁺ Population, wie auch der Phänotyp der mDCs unverändert blieb.

Ergebnisse

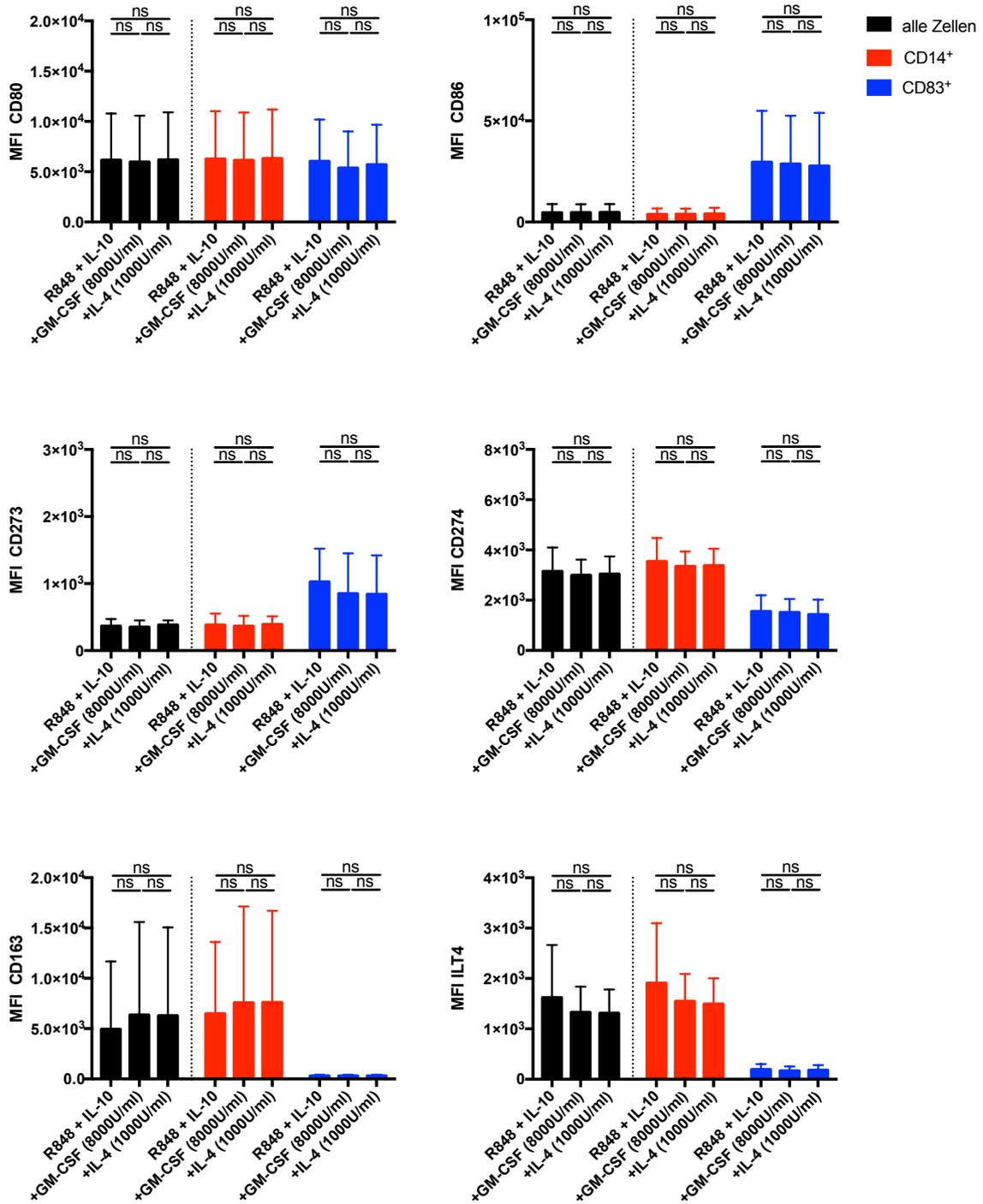


Abbildung 22: Antigenexpression ausgewählter Marker bei zehnfacher Konzentration von IL-4 und GM-CSF bei R848- und IL-10-stimulierten Zellen

iDCs wurden 24 h mit R848 stimuliert und mit IL-10 inkubiert. Zusätzlich erfolgte die Kultivierung der Zellen entweder in zehnfacher Dosierung von IL-4 (1000 U/ml) oder GM-CSF (8000 U/ml) (n=3, Mittelwert + SD, ANOVA).

4.4.2 Siebentägige Inkubationsdauer hat keinen Einfluss auf den M2c-like Makrophagen Phänotyp

In einem weiteren Experiment wurde der Frage nachgegangen, inwiefern eine längere Inkubationsdauer der Monozyten die Entwicklung zu iDCs und deren Plastizität und weiteren Entwicklung zu den beiden Subpopulationen beeinflusst und sich von der kürzeren viertägigen Kultur unterscheidet (Abbildung 23 und Abbildung 24). Die meisten Generierungsprotokolle gehen von fünf bis sieben Tagen Kulturdauer oder noch länger aus⁹.

Bei einer siebentägigen Kultivierung erkennt man, dass sich bei 24-stündigem Einfluss von R848 und IL-10 ebenfalls eine CD14⁺ und eine CD83⁺ Population bildeten, wobei letztere als mDCs klassifiziert wurde.

Die kostimulierenden Moleküle CD80 und CD86 wurden höher von den CD83⁺ mDCs exprimiert als von den CD14⁺ Zellen. Es zeigte sich, wie auch bei der kürzeren Kulturdauer, dass CD86 auf den mDCs auch unter IL-10-Einfluss deutlich höher als auf der CD14⁺ Population exprimiert wurde, aber IL-10 keinen großen Einfluss auf die Populationen einzeln betrachtet hat, sondern nur eine Verschiebung der Populationen zugunsten der CD14⁺ Zellen bedingt. Keine Veränderungen bewirkte IL-10 auch bezüglich der kostimulierenden Moleküle CD273, CD274 und ILT4 auf beiden Subpopulationen. Es zeigte sich wieder nur eine unterschiedlich hohe Expression im Vergleich der beiden Populationen untereinander.

Ein Vergleich der beiden Zellpopulationen nach sieben Tagen zeigt, dass der PD-1-Ligand CD273 auf den mDCs höher exprimiert wurde als auf der CD14⁺ Population, während CD274 als weiterer PD-1-Ligand gleichermaßen auf beiden Populationen gebildet wurde. Der regulatorische Rezeptor ILT4 wurde auf der CD14⁺ Population hingegen, wie in der verkürzten Kulturdauer, höher exprimiert als auf den mDCs.

Ergebnisse

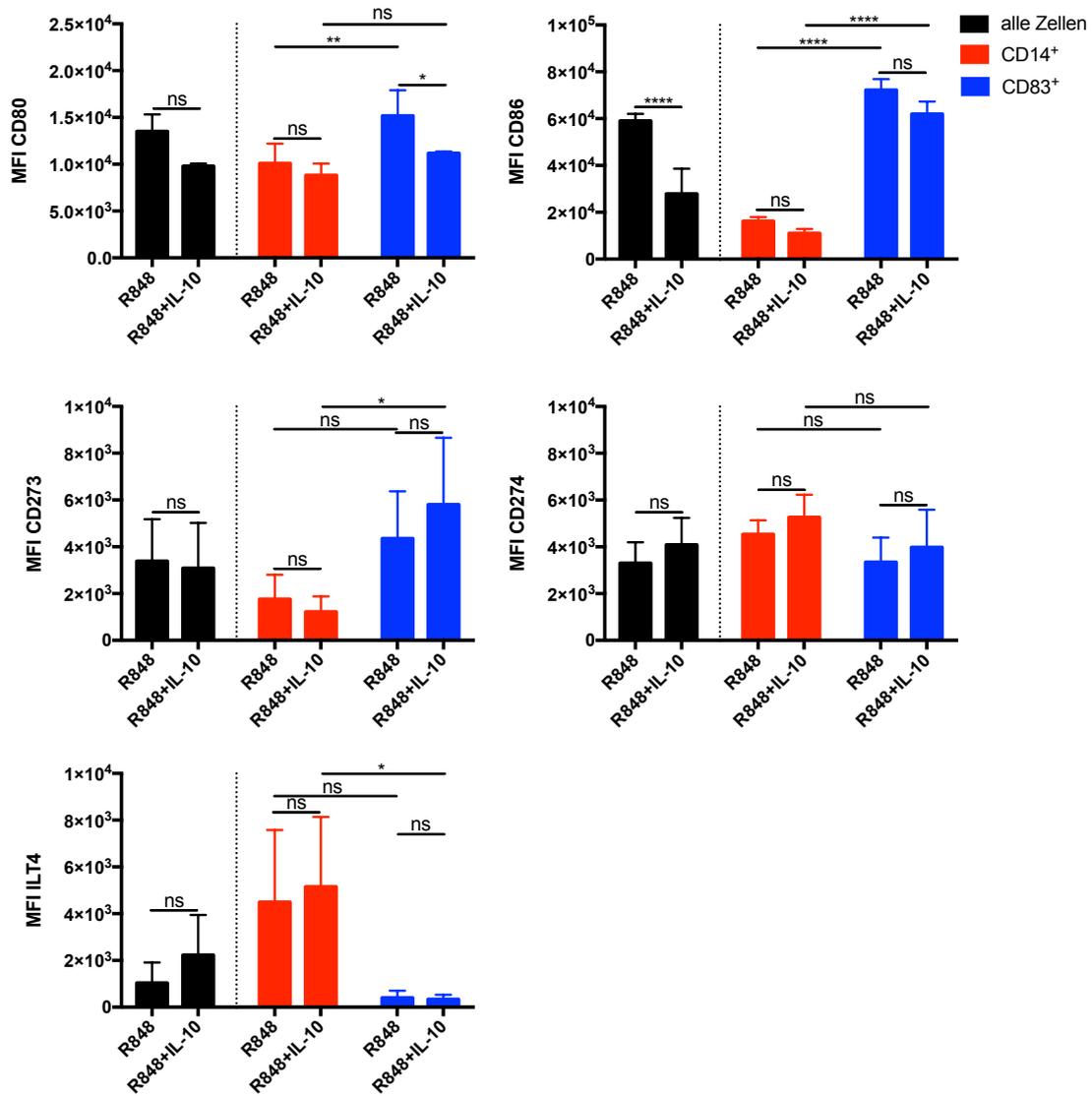


Abbildung 23: Antigenexpression von B7- und B2-Molekülen auf den Subpopulationen CD14⁺ und CD83⁺ bei siebentägiger Kultur

iDCs wurden an Tag 6 für 24 h nur mit R848 stimuliert oder zusätzlich mit IL-10 inkubiert (n=3, Mittelwert + SD, ANOVA).

Eine Betrachtung der Makrophagenmarker auf der CD14⁺ Population zeigte sowohl nach einer viertägigen als auch nach einer siebentägigen Inkubationsdauer einen ähnlichen Phänotyp. Auch hier wurde deutlich, dass die CD14⁺ Population im Vergleich zu den mDCs eine höhere Expression von CD36, CD91, CD163, CD206 und CX₃CR₁ zeigte, während CD204 nicht als Differenzierungsmarker dieser beiden Populationen herangezogen werden konnte. Außerdem wurde deutlich, dass IL-10 auf der CD14⁺ Population die Expression vom *scavenger receptor* CD163 signifikant steigert. Letztendlich ist auch nach sieben Tagen eine neue CD14⁺CD36⁺CD91⁺CD163⁺CD206⁺CX₃CR₁⁺ Population zu definieren, die im

Ergebnisse

Gegensatz zu den mDCs ausdifferenziert. Ein Unterschied zwischen einer vier- oder siebentägigen Kulturdauer konnte nicht beobachtet werden.

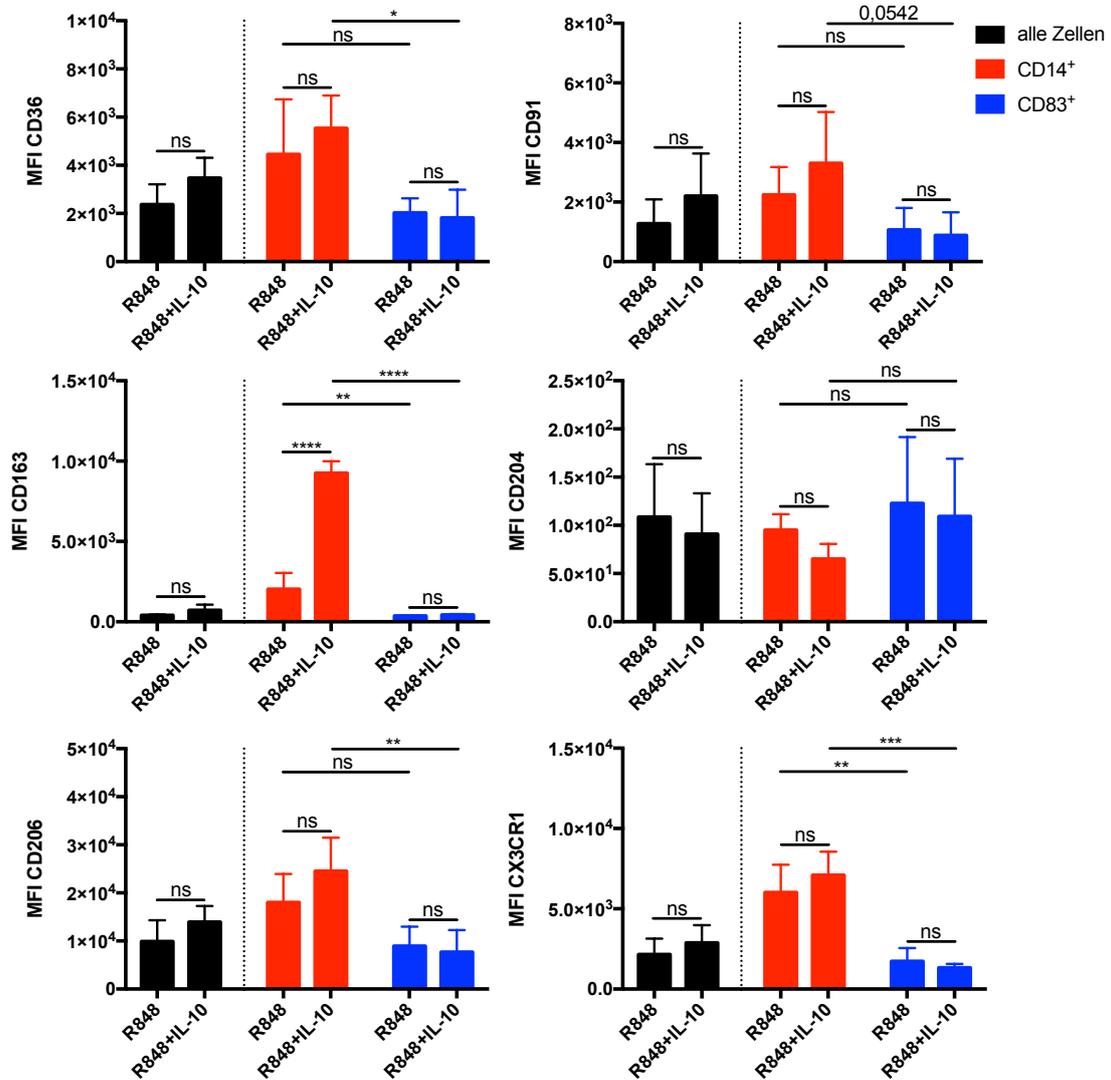


Abbildung 24: Antigenexpression von Makrophagenmarkern auf den Subpopulationen CD14⁺ und CD83⁺ bei siebentägiger Kultur
iDCs wurden an Tag 6 für 24 h nur mit R848 stimuliert oder zusätzlich mit IL-10 inkubiert (n=3, Mittelwert + SD, ANOVA).

4.5 M2c-like Makrophagen: gesteigerte Makropinozytose

Dendritische Zellen und Makrophagen sind in der Lage, Antigene über Endozytose aufzunehmen. Eine besondere Form der Endozytose ist die Makropinozytose, die auch bei der Dextran-Aufnahme der Zellen erfolgt. Dies wurde bei verschiedenen stimulierten iDCs mit FITC-Dextran getestet. Als Stimuli dienten R848, IL-10 oder deren Kombination.

Dabei ist zu erkennen, dass eine längere Inkubationszeit mit Dextran die Antigen-Aufnahme steigert (Abbildung 25). Vergleicht man die beiden $CD14^+$ und $CD83^+$ Subpopulationen, so lässt sich in allen unterschiedlich stimulierten Gruppen nach 90 min ein signifikanter Unterschied bezüglich der Dextran-Aufnahme feststellen ($p < 0,0001$), sodass die beiden Subpopulationen verschieden charakterisiert werden können. $CD14^+$ Zellen zeigten eine gesteigerte Antigen-Aufnahme, während die ausgereiften dendritischen Zellen in allen Gruppen kaum Dextran aufnehmen konnten.

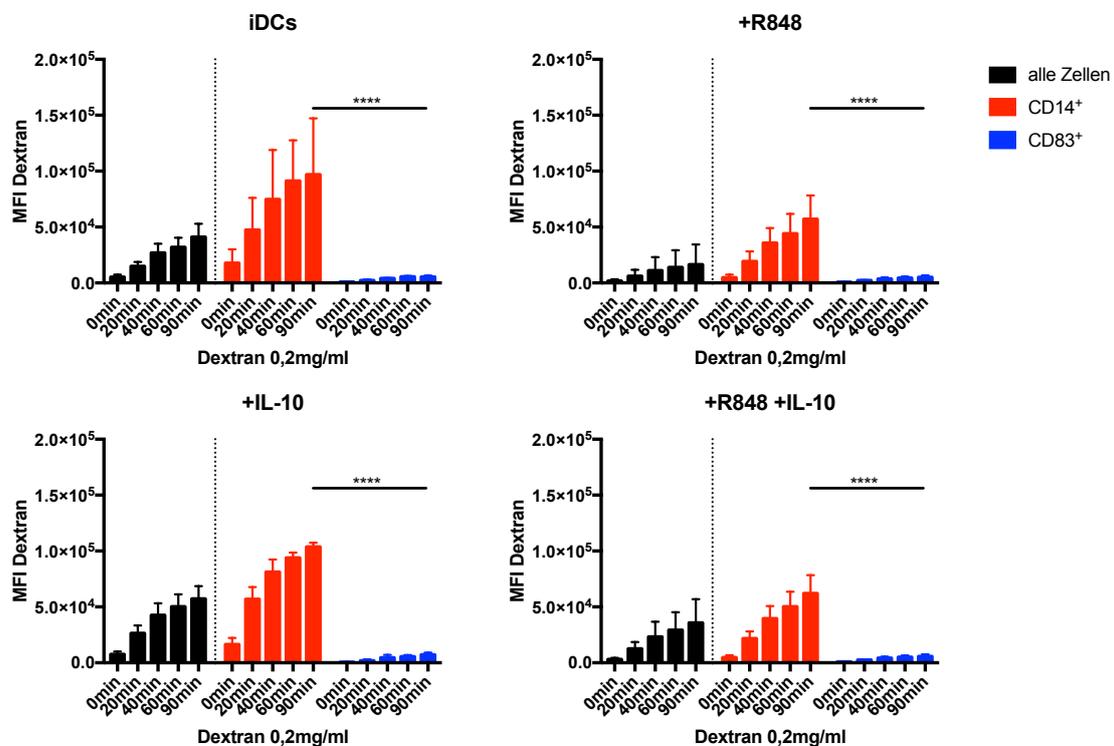


Abbildung 25: Dextran-Aufnahme der $CD14^+$ und $CD83^+$ Population bei unterschiedlichen Inkubationszeiten

iDCs wurden 24 h mit R848 behandelt und/oder mit IL-10 inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen bis zu 90 min mit Dextran inkubiert und die Dextran-Aufnahme gemessen ($n=3$, Mittelwert + SD, ANOVA).

Ergebnisse

Vergleicht man die verschiedenen stimulierten Zellpopulationen nach 90-minütiger Dextran-Aufnahme untereinander, so waren insgesamt betrachtet nur minimale Unterschiede zu erkennen (Abbildung 26). Keine Unterschiede zeigten sich dann in den beiden Subpopulation, die unabhängig vom Stimulus viel (CD14⁺ Zellen) oder wenig (CD83⁺ Zellen) Dextran aufnehmen konnten. Die CD14⁺ Population nahm, wenn sie zusätzlich mit IL-10 inkubiert wurde, genauso viel Dextran auf wie ohne die zusätzliche IL-10-Inkubation.

Bei allen Stimuli zeigte sich, dass die CD14⁺ Population im Vergleich zu den ausgereiften Zellen eine deutlich gesteigerte Makropinozytose und damit Antigen-Aufnahme hatte. Die CD14⁺ Zellen können damit auch funktionell als eine andere Population im Vergleich zu den CD83⁺ dendritischen Zellen definiert werden.

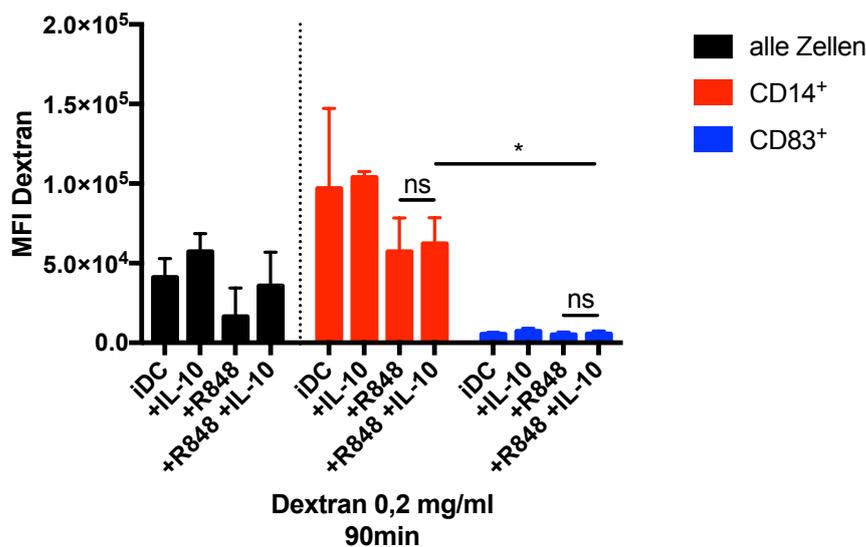


Abbildung 26: Dextran-Aufnahme bei unterschiedlicher Stimulation nach 90 min

iDCs wurden 24 h entweder mit R848 stimuliert und/oder mit IL-10 inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen für 90 min mit Dextran inkubiert (n=3, Mittelwert + SD, ANOVA).

4.6 Zytokinsekretion

Um die Zellen funktionell weiter zu charakterisieren, wurden Zytokine im Überstand der stimulierten Zellen mittels ELISA gemessen. Dabei war technisch eine Unterteilung in Subpopulationen nicht möglich, da die Zytokinsekretion von allen Zellen ausgeht und nachträglich die Produktion weder den CD83⁺ noch den CD14⁺ Zellen separat zugeordnet werden kann. Wie in den Versuchen zuvor bereits gezeigt, fördert die kombinierte Inkubation mit IL-10 und R848 den Phänotyp von M2c-like Makrophagen, während eine alleinige Stimulation mit R848 ohne exogene IL-10-Gabe vermehrt die Ausbildung von CD83⁺ mDCs fördert.

4.6.1 IL-6-Sekretion wird durch IL-10 inhibiert

Makrophagen sezernieren abhängig vom Mikromilieu *in vivo* IL-6, was sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch wirken kann. *In vitro* wurden iDCs für 24 h mit IL-10, R848 oder beiden Stimuli aktiviert und die IL-6-Sekretion gemessen (Abbildung 27). Während iDCs, die vier Tage kultiviert wurden, kaum IL-6 sezernierten (135 pg/ml), zeigten die R848-stimulierten Zellen eine 55-fach höhere Sekretion (7500 pg/ml) des Zytokins. Wurden die Zellen nur mit IL-10 behandelt, war ebenfalls die Sekretion sehr gering (130 pg/ml). Auffällig war, dass IL-10 die Sekretion der R848-stimulierten Zellen ebenfalls stark reduzierte (573 pg/ml). Ein ähnliches Bild zeigten die CD14-depletierten Zellen, also Zellen, die nach 72-stündiger Ausreifung zu iDCs vor weiterer Stimulation keine CD14-Expression mehr aufwiesen, indem verbliebene CD14⁺ Zellen aus der Zellkultur entfernt wurden. Auch hier wurde IL-6 nach alleiniger TLR-Stimulation deutlich mehr sezerniert (6998 pg/ml) als bei zusätzlicher IL-10-Gabe (511 pg/ml). Der Effekt war auch nach siebentägiger Inkubationsdauer zu sehen, wobei die IL-6-Sekretion insgesamt gesteigert war.

Ergebnisse

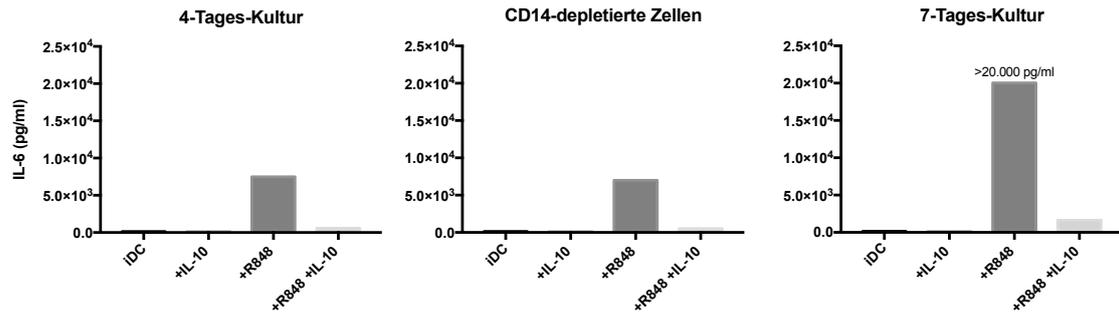


Abbildung 27: IL-6-Sekretion bei R848- und/oder IL-10-inkubierten Zellen

iDCs wurden entweder mit IL-10, R848 oder beidem inkubiert. Die Sekretion von IL-6 wurde bei Zellen, die entweder vier oder sieben Tage kultiviert wurden, sowie bei CD14-depletierten Zellen, die vier Tage in Kultur waren, gemessen (n=1).

Die Versuche demonstrieren, dass IL-10 einen Effekt auf die Sekretion aller Zellen hatte. Um zu beobachten, inwiefern IL-10 dosisabhängig die IL-6-Sekretion bei R848-stimulierten Zellen senkt, wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von IL-10 inkubiert (Abbildung 28). Es zeigte sich, dass erst höhere Konzentrationen von IL-10 ab 4 ng/ml die Sekretion inhibierte und bei 40 ng/ml die Sekretion um das 13-Fache im Vergleich zu der Kontrolle gesenkt wurde.

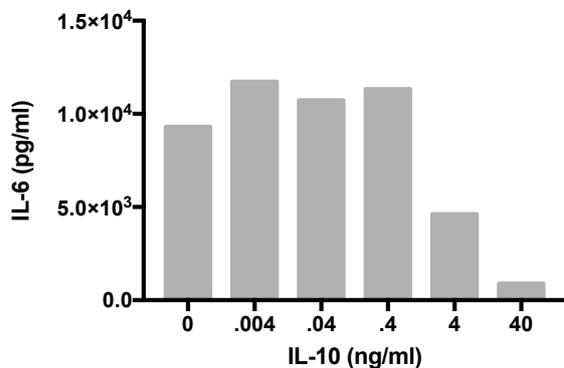


Abbildung 28: IL-6-Sekretion bei R848-Stimulation und IL-10-Titration

iDCs wurden 24 h mit R848 stimuliert. Zusätzlich erhielten die Zellen eine Stunde vor R848-Stimulation IL-10 in unterschiedlichen Konzentrationen (n=2).

Des Weiteren wurde getestet, ob TNF- α die IL-10-induzierte Suppression von IL-6 aufhebt. Hier zeigte sich, dass TNF- α ähnlich wie IL-10 wirkt und bereits selbst ab geringen Konzentrationen von 0,001 ng/ml die Sekretion von IL-6 supprimierte (Abbildung 29).

Ergebnisse

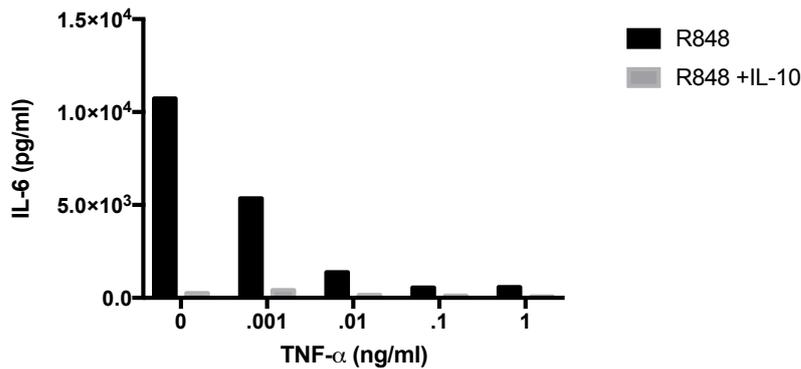


Abbildung 29: IL-6-Sekretion bei zusätzlicher TNF- α -Präinkubation

iDCs wurden 24 h mit R848 allein oder zusätzlich IL-10 stimuliert. Zusätzlich erhielten alle Zellen für 24 h vor Stimulation TNF- α in unterschiedlichen Konzentrationen (n=1).

4.6.2 CCL17-Sekretion wird durch IL-10 nicht beeinflusst

Das Chemokin CCL17 wird u.a. von bestimmten Populationen von Makrophagen und dendritischen Zellen produziert. Es wurde mittels ELISA bestimmt, inwiefern R848 und IL-10 einen Einfluss auf die Produktion haben (Abbildung 30).

In der viertägigen Kultur wurde deutlich, dass iDCs das Chemokin basal produzierten (25254 pg/ml) und R848 die Sekretion anregte (57188 pg/ml). IL-10 hatte keinen Effekt auf die Produktion. Dieses Bild wurde ebenfalls bei den CD14-depletierten Zellen deutlich. Bei CD14-depletierte Zellen wurden unmittelbar vor weiterer Stimulation und Ausdifferenzierung von iDCs der Anteil CD14-exprimierender Zellen entfernt, sodass nur CD14⁻ Zellen weiter kultiviert wurden. Wurden iDCs für sieben Tage kultiviert, war die basale Sekretion insgesamt höher (111597 pg/ml) und wurde durch R848 ebenfalls gesteigert (145361 pg/ml). IL-10 zeigte auch hier kaum einen Effekt auf die CCL17-Produktion.

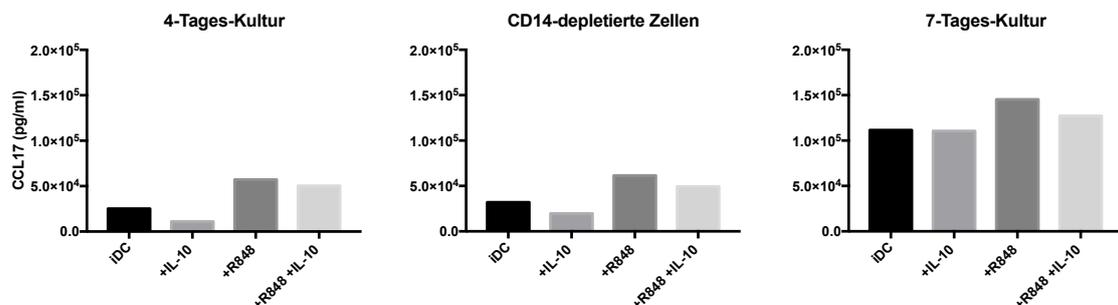


Abbildung 30: CCL17-Sekretion bei R848- und IL-10-stimulierten Zellen

iDCs wurden entweder mit IL-10, R848 oder beidem inkubiert. Die Sekretion von CCL17 wurde bei Zellen, die entweder vier oder sieben Tage kultiviert wurden, sowie bei CD14-depletierten Zellen, die vier Tage in Kultur waren, gemessen (n=1).

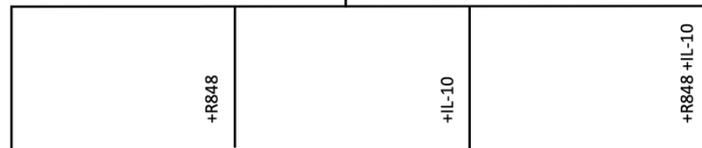
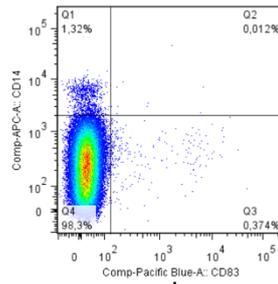
4.7 slan⁺ Zellen: Betrachtung einer *in vivo* relevanten Population

Es wurde versucht festzustellen, inwiefern sich die Ergebnisse einer R848- und IL-10-Stimulation der mo-DCs auf eine andere Zellpopulation, den slan⁺ Zellen, übertragen lassen, da diese bekannterweise viele phänotypische und funktionelle Eigenschaften anderer DC-Populationen gemeinsam haben^{22,24}. Schäkel et al. beschrieben erstmalig diese wenig kultivierten APCs, die 0,5-2% aller mononukleären Zellen des peripheren Blutes ausmachen und durch slan, eine Kohlenhydrat-Modifikation von *P-selectin glycoprotein ligand-1*, charakterisiert sind²³.

Im Gegensatz zu den Monozyten-gereiften iDCs wurde bei den slan⁺ Zellen, die differenzierte APCs darstellen, unter R848- und IL-10-Inkubation das Antigen CD14 nicht reexprimiert, sodass auch keine neue CD14⁺ Population gebildet wurde (Abbildung 31 und Abbildung 32). Der Reifungsmarker CD83 hingegen wurde bei TLR-Stimulation vermehrt gebildet, während die zusätzliche Inkubation mit IL-10 dessen Expression reduzierte. Ein Vergleich einer CD14⁺ und CD83⁺ Population war durch die fehlende CD14⁺ Zellpopulation nicht möglich.

Ergebnisse

A



B

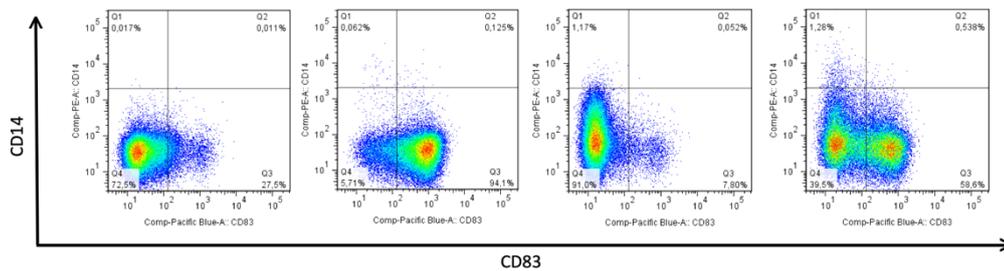


Abbildung 31: Differenzierung von slan⁺ Zellen nach R848- und/oder IL-10-Inkubation

A Darstellung von slan⁺ Zellen nach Aufreinigung von PBMCs an Tag 0 hinsichtlich ihrer CD14 und CD83-Expression. **B** Darstellung von slan⁺ Zellen nach 48 h in Kultur. Die Zellen erhielten nach 24-stündiger Kultur in GM-CSF und IL-4 entweder keine weitere Stimulation oder eine 24-stündige Stimulation mit R848, IL-10 oder deren Kombination. Je nach Inkubation und Stimulation exprimieren die Zellen CD83 in unterschiedlich hoher Intensität, aber kein CD14.

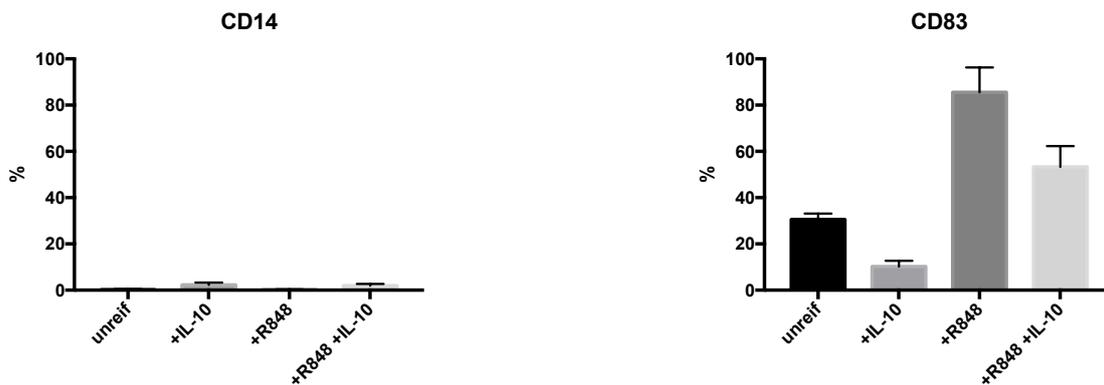


Abbildung 32: CD14- und CD83-Expression von slan⁺ Zellen

Slan⁺ Zellen wurden aus PBMCs isoliert und an Tag 1 für 24 h mit R848 und/oder IL-10 inkubiert (n=3, Mittelwert + SD).

Nachdem untersucht wurde, welchen Effekt R848, IL-10 oder deren kombinierter Gabe auf die weitere Differenzierung von slan⁺ Zellen hat und gezeigt werden konnte, dass sich eine CD14⁺ Population nicht bildet und eine CD83⁺ Population quantitativ abhängig von

Ergebnisse

der Stimulation ist, wurde im Folgenden ein qualitativer Effekt von IL-10 auf die slan⁺CD83⁺ Zellpopulation untersucht (Abbildung 33).

Dabei zeigte sich vergleichbar zu den Experimenten mit mo-DCs eine verminderte Expression des kostimulierenden Moleküls CD86 bei IL-10-Gabe auf allen Zellen. Slan⁺CD83⁺ Zellen zeigten allerdings unter IL-10-Einfluss wie auch mo-DCs keine verminderte Expression dieses Oberflächenmarkers verglichen mit den slan⁺CD83⁺ Zellen ohne IL-10-Einfluss. Dies begründet sich in der quantitativen Verschiebung der slan⁺CD83⁺ Zellen, die unter IL-10 Einfluss anteilmäßig weniger zu CD83⁺ Zellen ausdifferenzieren. Ebenfalls zeigte sich, dass das Antigen CD163, das vor allem auf CD14⁺ Zellen hoch exprimiert wird, auf den ausdifferenzierten CD83⁺ Zellen nicht wesentlich reguliert wurde. Im Gegensatz dazu fand eine geringe Hochregulierung des PD1-Liganden CD273 auf den ausgereiften slan⁺CD83⁺ Zellen unter zusätzlicher IL-10-Inkubation statt. Dies ist vergleichbar mit der vermehrten Expression von CD273 unter exogenem IL-10-Einfluss, die auch auf CD83⁺ mo-DCs stattfand.

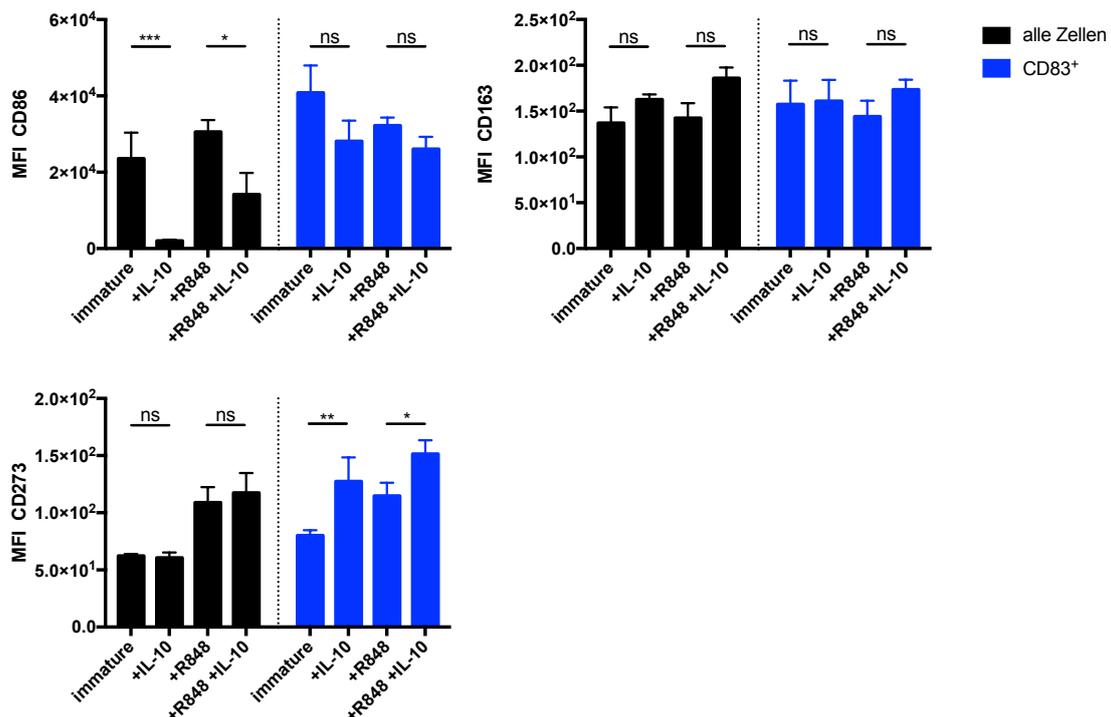


Abbildung 33: Antigenexpression ausgewählter Marker bei slan⁺ Zellen

Slan⁺ Zellen wurden aus PBMCs isoliert und an Tag 1 für 24 h mit R848 und/oder IL-10 inkubiert (n=3, Mittelwert + SD, ANOVA).

5 Diskussion

Mit der Immuntherapie wurde in der Behandlung von Krebserkrankungen eine weitere mögliche Therapiesäule neben der Chirurgie, Chemo- und Radiotherapie entwickelt. Auch wenn erste DC-Vakzinierungen in den 1990er Jahren bei Patienten mit B-Zell-Lymphom⁶¹ oder Melanom⁶² sehr vielversprechend schienen, zeigte diese neue Behandlungsstrategie dennoch insbesondere in der Behandlung solider Tumore nur eine limitierte Effektivität⁸⁵. Oftmals wurden in den Studien Patienten mit fortgeschrittenen und metastasierten Tumorstadien eingeschlossen. Folglich wurde die besondere Rolle des Zytokinmilieus des Tumors auf die applizierten DC-Vakzine diskutiert. Entscheidende Einflussfaktoren auf die Effektivität der Vakzine sowie auf die Entwicklung der Zellpopulationen sind dementsprechend die Aufarbeitung und die optimalen Reifungsbedingungen der Zellpräparate. *In vitro* Analysen der Zellpräparate unter verschiedenen Bedingungen sind wichtig für das Verständnis und die Etablierung neuer Behandlungsstrategien. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der phänotypischen und funktionellen Charakterisierung dendritischer Zellprodukte *in vitro* unter dem Einfluss von IL-10 und einem TLR-Trigger.

5.1 CD14-Reexpression definiert alternative Zellaktivierung

Der Oberflächenmarker CD14 deutet allgemein auf Zellen myeloiden Ursprungs hin und wurde als Differenzierungsmarker von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen beschrieben⁸⁶. Vor zwei Jahrzehnten stellte man fest, dass Monozyten das Antigen CD14 herunterregulieren, wenn sie *in vitro* unter dem Einfluss von IL-4 und GM-CSF zu dendritischen Zellen ausdifferenzieren^{79,87}. Abhängig vom Reifungsstadium exprimierten dendritische Zellen CD14 nicht mehr.

Der aktuelle Forschungsstand beschreibt die Diversität und Plastizität dendritischer Zellen differenzierter, sodass man davon ausgeht, dass auch einige reife Subpopulationen dendritischer Zellen CD14 exprimieren. Allerdings wird die Klassifikation von antigenpräsentierenden Zellen, zu denen auch dendritische Zellen gehören, besonders bei Infektionen und unter inflammatorischen Bedingungen zu einer Herausforderung. Die exakte Zuordnung der APCs zu dendritischen Zellen wird dadurch erschwert. Mit der Expression von CD14 assoziiert werden u.a. inflammatorische Monozyten-gereifte dendritische Zellen. Diese kommen vor allem unter *steady-state* Bedingungen vor⁸⁸.

Andere Autoren zeigten aber weiterhin, dass inflammatorische mo-DCs neben CD14, auch CD206, CD209 sowie CD163 exprimierten⁸⁹, also auch Marker, die Makrophagen zugeordnet werden. Dies verdeutlichte den auch hier diskutierten dualen Charakter von mo-DCs, der einerseits als *DC-like* und andererseits als *macrophage-like* von den Autoren beschrieben wurde. Neben inflammatorischen mo-DCs wurden auch *monocyte-like* CD14⁺ cDC2 beschrieben, die u.a. zusätzlich CD32, CD36 und CD163 exprimierten^{90,91}. Als *in vivo* Korrelat für CD14⁺ DCs wurden u.a. inflammatorische CD11c⁺ CD14⁺ CD163⁺ CCR2⁺ DCs in der Darmmukosa von Patienten mit Zöliakie nach Gluten-Aufnahme gefunden⁹². Des Weiteren definierten Segura et al. CD1c⁺ CD11b⁺ CD14⁺ CD206⁺ DCs in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis sowie im Aszitis von Tumorpatienten⁹³.

Die Beispiele verdeutlichen, dass eine klar definierte Einteilung der verschiedenen Subpopulationen von DCs nicht existiert. Dennoch konnten verschiedene *in vitro* und *in vivo* CD14⁺ DCs beschrieben werden. Diese Studie zeigt zunächst im Einklang mit der Literatur, dass die Differenzierung von Monozyten zu mo-DCs eine Herabregulierung von CD14 bedingt. Die Zellen wurden dann als *immature DCs* bezeichnet. Abhängig vom Stimulus konnte eine unterschiedlich starke Reexpression von CD14 festgestellt werden. Durch die Auswahl der *gates* wird nun gezeigt, dass diese Reexpression invers mit der CD83-Expression korreliert, also jenem Marker, der eine ausgereifte dendritische Zelle *in vitro* kennzeichnet. Entweder exprimierten die Zellen CD14 oder CD83. Eine ausgereifte dendritische CD83⁺ Zelle exprimierte aber nicht CD14 respektive exprimierte eine CD14⁺ Zelle nicht CD83.

In der Literatur wird diese Unterscheidung nicht getroffen. Muñoz et al. beschrieben in einer kürzlich veröffentlichten Studie u.a. mo-DCs, die als Reifungsstimuli nach 5 Tagen Vitamin D3 und LPS erhielten⁹⁴. In Anwesenheit von Vitamin D3 zeigte sich eine hohe CD14-Expression im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen. Nach zusätzlichem LPS-Stimulus war die Expression von CD83 und CD86 niedrig, sodass die DCs folglich als *semi-mature* beschrieben wurden. Die Zellen wurden allerdings nach der Stimulation als gesamte Population und nicht separat betrachtet. Trotz CD14-Expression wurden die Zellen als DCs bezeichnet, jedoch mit reduzierter kostimulierender Funktion. Die vorliegende Studie unterscheidet mit der Setzung der *gates* zwischen reifen CD83⁺ dendritischen Zellen und immunregulatorischen CD14⁺ Zellen und betrachtet damit zwei Populationen separat.

Diskussion

Die Beobachtungen belegen, dass sich die immunregulatorischen CD14⁺ Zellen aus iDCs durch die Reexpression von CD14 entwickeln. Die stärkste CD14-Reexpression zeigte sich, wenn iDCs mit IL-10 und dem TLR-Agonisten R848 stimuliert wurden. Bereits IL-10 alleine steigerte die CD14-Reexpression signifikant. Am effektivsten allerdings, hinsichtlich der Ausdifferenzierung zur CD14⁺ Population, stellte sich die Kombination beider Stimuli mit einstündiger Präinkubation von 40 ng/ml IL-10 vor R848-Gabe heraus. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass unter dieser Kombination weiterhin eine CD83⁺ Population gebildet wurde. Die CD83⁺ Population weist auf reife, ausdifferenzierte, dendritische Zellen hin.

Zudem konnte demonstriert werden, dass die CD14-Reexpression *de novo* entsteht, indem iDCs vor IL-10- und R848-Stimulation CD14-depletiert wurden. Die depletierten Zellen zeigten nach Stimulation ebenfalls eine signifikante CD14-Reexpression.

In dieser Arbeit sollte auch geklärt werden, ob andere Einflussfaktoren Auswirkungen auf die CD14-Reexpression haben. Neben den Reifungsstimuli R848 und IL-10 erhielten die Monozyten zunächst zur Ausdifferenzierung zu iDCs sowohl IL-4 als auch GM-CSF. Holla et al. konnten zeigen, dass erst die Kombination beider Zytokine eine Differenzierung zu iDCs ermöglicht⁹⁵. Auch für die erfolgten Experimente waren die beiden Zytokine wichtige Parameter. Es wurde der Frage nachgegangen, welchen Einfluss die Zytokine jeweils auf die CD14-Reexpression und damit Ausbildung einer neu definierten Zellpopulation haben. Dazu wurde jeweils die zehnfache Dosierung von IL-4 (1000 U/ml statt 100 U/ml) und GM-CSF (8000 U/ml statt 800 U/ml) an den Tagen 1 und 3 nach Beginn der Zellkultur verwendet. Aus der Literatur ist bekannt, dass Monozyten bei hohen Konzentrationen von GM-CSF und in Abwesenheit einer Inflammation nicht zu mo-DCs heranreifen⁹⁶. Zudem ist es bestätigt, dass hohe Konzentrationen an IL-4 einen reifen dendritischen Zelltyp fördern, während niedrige Dosierungen zu einem unreifen Phänotyp führen⁹⁷. Diese Studien zeigen, dass die richtige Dosierung der Zytokine Auswirkungen auf die Entwicklung der Zellpopulationen hat. Vor diesem Hintergrund war es wichtig zu untersuchen, ob dies auch für die Entwicklung der CD14⁺ Zellpopulation gilt. In diesen Experimenten konnte bei unterschiedlich hohen Dosierungen sowohl von GM-CSF als auch von IL-4 kein Effekt auf die Entwicklung der CD14⁺ Zellpopulation festgestellt werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass andere Zytokine, wie IL-10, verantwortlich für die CD14-Expression gemacht werden können.

Nicht untersucht wurde in diesen Experimenten, welchen Einfluss die Zytokinkonzentrationen außerhalb des gewählten Bereichs haben oder inwiefern der Zeitpunkt der Stimulation eine Rolle spielt.

Viele therapeutische Ansätze mit DC-Vakzinen basieren auf standardisierten Protokollen mit DCs, die sieben bis zehn Tage generiert werden^{98,99}. Es wurden aber auch Protokolle entwickelt, die eine kürzere Reifungsdauer evaluierten¹⁰⁰. Diese konnten zeigen, dass sich der Phänotyp und die Kapazität zur Stimulation zytotoxischer T-Zellen bei einer Reifungsdauer von drei bzw. sieben Tagen nicht wesentlich unterscheiden. Es sollte geklärt werden, inwiefern sich eine unterschiedlich lange Kulturdauer auf die Ausdifferenzierung der Zellen und damit auch CD14-Expression auswirkt. Dazu wurden iDCs, die 72 h oder 144 h in Kultur waren und anschließend den 24-stündigen Reifungsstimulus erhielten, unterschieden. Dabei konnte aufgezeigt werden, dass die kombinierte Stimulation von IL-10 und R848 auch bei längerer Kulturdauer von sieben Tagen eine Heraufregulierung von CD14 bedingt und die resultierende Zellpopulation einen stabilen Phänotyp zeigt. Damit unterscheiden sich die Differenzierungswege der mo-DCs bei kürzerer Reifungsdauer nicht.

Nicht nur unterschiedlich hohe Konzentrationen von Zytokinen und die Reifungsdauer der Zellen sind wichtige Parameter in der Entwicklung heterogener Zellpopulationen. Auch unterschiedliche Zeitpunkte der Stimulation mit den Zytokinen beeinflussen den Zelltyp. Steinbrink et al. beschrieben dendritische Zellen, die im ausgereiften und späten Zustand resistent gegenüber IL-10 waren⁵⁰. Ein früherer Zeitpunkt einer IL-10-Stimulation der unreifen dendritischen Zellen hingegen zeigte nach FACS-Analyse eine Herabregulierung der Gesamt-MFI einiger kostimulierender Moleküle. 2017 analysierten Sandner et al. den zeitabhängigen Einfluss von IL-4 auf die *in vitro* Differenzierung humaner Monozyten¹⁰¹. Danach befürwortete die Arbeitsgruppe ein dynamisches Modell, in dem der Monozyten-gereifte Zelltyp abhängig vom Zeitpunkt und der Dauer der Stimulation zu betrachten ist. Die dichotome Aufteilung Monozyten-gereifter Zellen in Makrophagen bzw. dendritische Zelle wurde damit weitestgehend verlassen.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde der zeitabhängige Einfluss eines Zytokins auf die Entwicklung von Monozyten-gereiften Zellen untersucht. Bekannt ist, dass TNF- α eine Reifung von Monozyten zu dendritischen Zellen fördert¹⁰². Unter anderem nimmt die Expression von CD80 und CD83 von dendritischen Zellen bei TNF- α -Stimulation zu.

Untersucht wurde, welchen Einfluss TNF- α auf die CD14-Reexpression von unreifen dendritischen Zellen hat, bevor die CD14-Reexpression mit IL-10 und R848 induziert wird. Die iDCs erhielten 24 h vor der IL-10/R848-induzierten CD14-Reexpression unterschiedlich hohe Konzentrationen an TNF- α . Interessanterweise zeigte sich, dass die 24 h später erfolgte Gabe von IL-10 und R848 nicht die zu erwartende CD14-Reexpression förderte. Der Anteil einer CD14⁺ Population sank um das 5-Fache im Vergleich zu den nicht behandelten Zellen. Die Zellen waren also durch die Präinkubation mit TNF- α zu dem Zeitpunkt resistent gegenüber der IL-10/R848-induzierten CD14-Reexpression. Nicht nur die richtige Dosierung von Zytokinen, sondern auch die richtige Reihenfolge der Zytokine bestimmt folglich den Differenzierungsweg der Zelle. Das könnte auch den klinischen Einsatz dendritischer Zellen verändern und vom Tumor produziertem IL-10 entgegenwirken. Der Tumor verliert damit einen Mechanismus zur Immunevasion. Eine systemische Blockade von IL-10 birgt allerdings das Risiko negativer autoimmuner Reaktionen, sodass eine lokale Blockade des Zytokins in Tumornähe erfolgen sollte. Spezifische IL-10-Rezeptor-Blocker wurden bisher im murinen Modell bei Ovarialtumor erfolgreich getestet¹⁰³. Der therapeutische Ansatz kann nun ergänzt, bzw. erweitert werden. Unerwünschte Regulierungen von IL-10 auf die Zellen könnten durch den dosierten und gezielten Einsatz von TNF- α ausbleiben und die Effektivität von DC-Vakzinen gesteigert werden.

Parallel zu den Untersuchungen mit TNF- α wurden auch Präinkubationen mit PGE₂ durchgeführt. Im Einklang mit der Literatur stieg die CD14-Expression mit zunehmender Konzentration von PGE₂¹⁰⁴. Ein zeitabhängiger Einfluss konnte hier nicht beobachtet werden.

5.2 IL-10 bewirkt quantitative Veränderungen bei Monozytengereiften Zellen

Versuche von Steinbrink et al. definierten DCs, die nach IL-10-Stimulation einen tolerogenen Charakter zeigten⁵⁰. Dies äußerte sich in einer reduzierten Fähigkeit Antigene zu präsentieren sowie einer reduzierten Expression kostimulierender Moleküle wie CD86. Eine kürzlich erschienene Studie beschreibt die Herabregulierung von CD86 auf mo-DCs im von Ovarialtumoren produzierten Aszites¹⁰⁵. Den Autoren nach ist

autokrin produziertes IL-10 für die reduzierte Expression verantwortlich. Nach Stimulation mit einem der drei TLR-Stimuli R848, LPS oder polyI:C und in Anwesenheit von 25% Aszites konnten die Forscher eine deutliche Reduktion von CD86 auf dendritischen Zellen gegenüber der Abwesenheit von Aszites feststellen. Außerdem wurde eine reduzierte Sekretion von IL-6, IL-12p40 und TNF- α beobachtet. Im Gegensatz dazu zeigen die in dieser Arbeit dargestellten Experimente nun, dass unter zusätzlichem IL-10-Einfluss die Funktion und der Phänotyp dendritischer Zellen beibehalten wird und die tolerogenen Eigenschaften IL-10-stimulierter Zellprodukte anders zu erklären sind.

Durch die Reexpression von CD14 kann ein Zelltyp definiert werden, der den CD83⁺ dendritischen Zellen gegenüber steht. Dies weist darauf hin, dass IL-10 zur Entwicklung zwei verschiedener Zellpopulationen beiträgt. Dadurch lässt sich die unterschiedliche Expression kostimulierender und immunsupprimierender Moleküle nach IL-10-Inkubation erklären. Das Zytokin bewirkt eine quantitative Veränderung der Zellpopulationen und führt einerseits zu einer erhöhten Anzahl an CD14⁺ Zellen und andererseits zu einer reduzierten Anzahl an CD83⁺ Zellen. Die beiden Zellpopulationen zeigen wiederum eine unterschiedliche Rezeptorexpression, bzw. unterschiedliche Intensitäten, ohne dass IL-10 viele der Moleküle direkt beeinflusst. Auch Steinbrink et al. konnten sehen, dass IL-10 eine reduzierte Anzahl an CD83⁺ Zellen bewirkt⁵⁰. Die qualitativen Veränderungen der CD83⁺ dendritischen Zellen mit verändertem Phänotyp nach IL-10-Stimulation können zum Teil nun widerlegt werden. Die durchgeführten Experimente zeigen, dass die CD83⁺ dendritischen Zellen auch bei IL-10-Stimulation CD86 genauso hoch exprimieren wie die unstimulierte Kontrolle, was nur durch die quantitative Verschiebung zu erklären ist. Die Heraufregulierung der immunmodulatorischen Marker CD274 und ILT4 lassen sich ebenfalls durch eine quantitative Verschiebung erklären. Auch wenn nach IL-10/R848-Stimulation beide Marker insgesamt vermehrt exprimiert wurden, ist dies auf die vermehrte Bildung der CD14⁺ Zellpopulation zurückzuführen und nicht auf eine erhöhte Expression auf den dendritischen Zellen. Beide Marker dienen der Toleranzbildung *in vivo* und wurden von der CD14⁺ Zellpopulation im Vergleich zu den CD83⁺ dendritischen Zellen deutlich vermehrt gebildet. Gleiches gilt für den Mannoserezeptor CD206, der vor allem von Makrophagen gebildet wird, die u.a. durch IL-10-Sekretion bei Feten für Toleranz gegenüber der mütterlichen Plazenta sorgen¹⁰⁶. Dieser wurde von der CD14⁺ Zellpopulation deutlich stärker als von den dendritischen Zellen exprimiert, sodass eine

erhöhte Expression vor allem auf die Verschiebung zu den CD14⁺ Makrophagen zurückzuführen ist. Interessanterweise zeigte sich auf diesen Zellen aber auch, dass IL-10 selbst die CD206-Expression nochmal steigerte. Dies kann man *in vivo* im Sinne einer Selbstverstärkung verstehen, bei der CD206⁺ Zellen IL-10 sezernieren und die Eigenproduktion zu einer verstärkten CD206-Expression führt.

Des Weiteren hatte IL-10 einen direkten Effekt auf die Expression des *scavenger receptors* CD163. Es ist deutlich zu sehen, dass CD14⁺ Zellen den für Makrophagen typischen Marker ersichtlich höher exprimierten als dendritische Zellen. Darüber hinaus war aber auch hier ein direkter dosisabhängiger Effekt auf die Zellen festzustellen. IL-10 als zusätzlicher Stimulus zu R848 steigerte die Expression auf dieser CD14⁺ Zellpopulation signifikant. Dieser Oberflächenmarker dient auf Makrophagen als Sensor für Gram-positive und -negative Bakterien¹⁰⁷ und wird vor allem den M2c-Makrophagen zugeordnet^{108,109}. Dies lässt vermuten, dass die CD14⁺ Zellpopulation auch den M2c-Makrophagen zugerechnet werden kann.

In den Überlegungen zur vorliegenden Arbeit wurden auch funktionelle Aspekte einbezogen und die Sekretion von IL-6 und CCL17 von den Zellen nach IL-10-Inkubation getestet. Allerdings war hier eine Unterteilung durch FACS-Analyse in eine CD14⁺ und eine CD83⁺ Population nicht möglich, da jeweils der Überstand aller Zellen verwendet wurde und eine Aufteilung der Zellpopulationen technisch schwierig war. Tolerogene IL-10-behandelte dendritische Zellen werden mit einer reduzierten Produktion von IL-6 assoziiert⁷⁴. Allerdings verdeutlichen *in vitro* Studien, dass reife dendritische Zellen große Mengen von IL-6 produzieren¹¹⁰. Die durchgeführten Experimente zeigen, dass eine zusätzliche IL-10-Inkubation eine dramatische Reduktion der IL-6-Produktion, gemessen im Überstand, bewirkt. Diesen Effekt könnte man nun anders deuten. M2 Makrophagen sezernieren im Gegensatz zu pro-inflammatorischen M1 Makrophagen und reifen dendritischen Zellen nur sehr geringe Mengen an pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6¹¹¹. Eine Verschiebung der Populationen durch IL-10 hin zu einer M2 Makrophagenpopulation und weg von einer reifen DC-Population könnte die Reduktion von IL-6 erklären. Verbliebene reife dendritische Zellen könnten deshalb weiterhin IL-6 produzieren.

Die angestellten Beobachtungen verdeutlichen, dass TNF- α die Ausbildung einer IL-10-induzierten CD14⁺ Population verhindert. Folglich wurde der Frage nachgegangen, ob TNF- α auch die IL-6-Suppression durch IL-10 aufhebt. Da TNF- α aber mit steigender

Konzentration die durch den TLR7/8-Agonisten R848 erhöhte IL-6-Produktion bereits ohne IL-10 wieder herunterregulierte, konnten keine Effekte beobachtet werden. Auch nach TNF- α -Präinkubation wurde bei IL-10-inkubierten Zellen kaum IL-6 gebildet.

Die Produktion von CCL17 ist typisch für M2 Makrophagen¹¹. Dementsprechend wurde die Zytokinsekretion der behandelten Zellpräparate auf dieses Zytokin hin getestet. Allerdings konnten keine nennenswerten Unterschiede in der Sekretion der unterschiedlich stimulierten Zellpräparate festgestellt werden. Ein Grund dafür könnte sein, dass CCL17 vor allem von M2a Makrophagen¹¹² produziert wird und nicht von anderen Makrophagenpopulationen. Die Rolle von CCL17 in anderen Makrophagenpopulationen, wie M2c-Makrophagen, muss weiter untersucht werden.

5.3 CD14⁺ M2c-like Makrophagen zeigen einen stabilen immunmodulatorischen Phänotyp

Myeloide Zelllinien sind durch eine hohe phänotypische Plastizität geprägt¹¹³. Dadurch gelingt es Tumoren u.a. durch die Sekretion von Zytokinen eine normale myeloide Reifung zu verhindern und eine Differenzierung zu immunsuppressiven Zellen zu bewirken. Dies führt zu Anergie und der Induktion regulatorischer T-Zellen^{114,115}. Das Tumormilieu wird folglich durch eine hohe Anzahl an Monozyten und Makrophagen sowie durch eine niedrige Anzahl an dendritischen Zellen geprägt, was in der Regel als prognostisch ungünstig gesehen wird. *In vitro* Studien konnten bereits zeigen, dass Tumor-assoziierte Zytokine die Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen blocken können und eine Entwicklung von CD14⁺ *M2 macrophage-like* Zellen¹¹⁶⁻¹¹⁸ oder *MDSC-like* Zellen¹¹⁹ mit supprimierender T-Zell-Aktivität fördern. Chen et al. stellten zudem fest, dass auch bereits ausgereifte dendritische Zellen *in vitro* unter dem Einfluss von Aszites von Ovarialzellkarzinomzellen, die IL-10 sezernieren, zu Makrophagen differenzieren können¹²⁰. Lindenberg et al. beschrieben ausgehend von diesen Ergebnissen CD14⁺ IL-10-mDCs mit einem *macrophage-like* Phänotyp, der durch eine kombinierte hohe Expression von CD14, BDCA3, DC-SIGN, CD163 und CD16, aber auch einer niedrigen CD83-Expression gekennzeichnet war¹²¹. Die dendritischen Zellen wurden folglich als unreif bezeichnet.

Mit dieser Arbeit wird gezeigt, dass auch unter IL-10-Stimulation dendritische Zellen mit reifem Phänotyp (CD83⁺) und insbesondere auch mit einer hohen Expression kostimulierender Moleküle wie CD86 gebildet werden. Dem gegenüber können wir nun

eine CD14⁺ Zellpopulation definieren. Diese ist durch die hohe Expression der für Makrophagen typischen Marker CD36 (Phagozytose), CD91 (Efferozytose), CD163 (Tumorprogression), CD206 (Phagozytose, Endozytose) und CX₃CR₁ (Adhäsion und Migration) gekennzeichnet. Die Oberflächenmoleküle CD163 und CD206 werden oft mit M2c-Makrophagen assoziiert. So werden auch in dieser Arbeit diese Zellen den M2c-Makrophagen zugeordnet. Es konnte nachgewiesen werden, dass diese eine hohe Endozytoseaktivität aufweisen. Des Weiteren zeigten die CD14⁺ Zellen eine hohe Expression immunsupprimierender und regulatorischer Rezeptoren wie ILT4 und CD274.

Zusammenfassend kann ein stabiler und regulatorischer Phänotyp von CD14⁺ M2c-Makrophagen definiert werden.

5.4 Therapeutische Anwendung

Zahlreiche Vakzinierungen mit dendritischen Zellen gegen Tumore wurden mit mo-DCs durchgeführt. Wimmers et al. stellten fest, dass *in vitro* behandelte Monozyten, die mit IL-4 und GM-CSF stimuliert wurden und zu mo-DCs heranreiften, oftmals keine effektive Tumorantwort bei den Patienten auslösen¹²². Verantwortlich für eine ineffektive Immunantwort kann neben der Diversität von Tumorzellen auch die Heterogenität der dendritischen Zellen sein. Diese spiegelt sich auf verschiedenen Ebenen wider: den Vorläuferzellen und deren Ausdifferenzierung, deren Funktion, deren Wirkungsort *in vivo* sowie letztendlich der provozierten Immunantwort¹²³. Mit der vorliegenden Arbeit kann ein möglicher Erklärungsansatz der reduzierten Effektivität auf der Ebene der Ausdifferenzierung und Funktion erbracht werden.

Viele klinische Ansätze mit dendritischen Zellen als Tumorstoffe zeigen, dass vor allem immunsuppressive Monozyten über verschiedene Mechanismen eine optimale antitumorale Immunantwort limitieren. Dafür verantwortlich scheinen u.a. CD14⁺ HLA-DR^{lo/neg} Monozyten zu sein, die bei Patienten unterschiedlicher Tumorentitäten in höherer Anzahl im Blut zirkulieren. Erhöhte Spiegel fanden sich bei Patienten mit Nierenzellkarzinom¹²⁴, CLL¹²⁵, Non-Hodgkin-Lymphom¹²⁶ sowie Glioblastom¹²⁷. Die Spiegel waren vergleichbar mit denen bei Sepsispatienten. Bei diesen tritt im Rahmen der Infektion die sogenannte Immunparalyse auf, die durch eine verminderte Expression von HLA-DR auf Monozyten charakterisiert und durch erhöhte

Level von IL-10 und PGE₂ gekennzeichnet ist. Der Verlust von HLA-DR wiederum ist mit einer funktionellen Deaktivierung von Monozyten assoziiert. In der Immuntherapie gegen Krebs bedeutet das, dass eine hohe Anzahl an CD14⁺ HLA-DR^{lo/neg} Monozyten möglicherweise bereits auf eine Immunparalyse bei dem Patienten hinweist und somit eine effektive antitumorale Therapie erschwert wird. Forschungsergebnisse von Mengos et al. zeigen, dass CD14⁺ HLA-DR^{lo/neg} Zellen invers mit der Anzahl CD83⁺ dendritischer Zellen korrelieren und damit ebenfalls zu einer verminderten Immunabwehr beitragen¹²⁸. Die durchgeführten Experimente zeigen ebenfalls, dass eine hohe Anzahl *in vitro* generierter immunsuppressiver CD14⁺ Zellen eine niedrige Anzahl CD83⁺ Zellen bedingt. Diese Zellen stellen möglicherweise das *in vivo* Korrelat CD14⁺ HLA-DR^{lo/neg} Monozyten dar. In der Produktion von Tumorstoffen kann die CD14⁺ Zellpopulation als ein Grund ineffektiver Vakzinierung verantwortlich gemacht werden und eine Immunsuppression bedingen. CD14 sollte deshalb grundsätzlich für die Qualitätskontrolle eines DC-Protokolls analysiert werden. Es ist erforderlich diese Zellen zukünftig in der Therapieplanung zu berücksichtigen, genauer zu analysieren und ihre Effekte *in vivo* zu bestimmen. Ein Ausschluss der immunsupprimierenden CD14⁺ Zellpopulation in der Produktion der Tumorstoffe kann möglicherweise den Therapieerfolg steigern.

5.5 Methodendiskussion

Die am besten untersuchten humanen dendritischen Zellen sind *in vitro* mo-DCs, da sie in großer Zahl produziert werden können und leicht zur Verfügung stehen¹²⁹. Dabei zeigte sich allerdings vor zehn Jahren, dass diese mehr Gemeinsamkeiten mit Monozyten haben als mit *in vivo* vorkommenden dendritischen Zellen¹³⁰. Ein Vergleich zwischen den *in vitro* generierten mo-DCs und in Blut zirkulierenden dendritischen Zellen wird damit erschwert. Es muss die Frage diskutiert werden, welcher Abstammung *in vivo* dendritische Zellen sind. Im murinen Modell konnten bereits 2003 zwei Studien zeigen, wie *in vivo* Monozyten zu DCs differenzieren^{131,132}. Diese ausdifferenzierten Zellen wurden den inflammatorischen dendritischen Zellen zugeordnet und konnten abhängig von den inflammatorischen Bedingungen eine T_{H1}-, T_{H2}-, oder T_{H17}-Antwort auslösen. Auch beim Menschen konnten mittlerweile mehrere Arbeitsgruppen zeigen, wie Monozyten *in vivo* zu dendritischen Zellen differenzieren. Auch wenn ein gemeinsamer Ursprung klar zu erkennen ist, unterscheiden sich dennoch die Versuchsbedingungen von

dem physiologischen Milieu für die Zellen, sodass die biologische Rolle von mo-DCs offenbleibt.

Zudem besteht eine hohe Variabilität der Zellen zwischen Spendern, wodurch identische Versuchsbedingungen bei mo-DCs verschiedener Spender zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können.

Wie sich die Ergebnisse und Methoden auf eine wenig kultivierte APC aus dem Blut übertragen lassen, wurde in einer Versuchsreihe mit slan⁺ Zellen, die viele Eigenschaften mit dendritischen Zellen teilen^{22-24,133,134}, getestet. Diese reifen nicht erst *in vitro* aus Monozyten zu dendritischen Zellen heran, sondern beschreiben einen fortgeschrittenen Differenzierungsgrad und eine alternative APC. 1998 beschrieben Schäkel et al. erstmalig diese Subpopulation humaner APCs und bezeichneten diese als slanDCs²². Slan (6-sulfo LaCNAc) ist eine Kohlenhydrat-Modifikation von *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1) und wird von 0,5-2% aller mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) exprimiert²¹. Damit kann diese Zellpopulation direkt aus dem Blut ohne weitere Kultivierung isoliert werden. Funktionell konnte die Sekretion von TNF- α und IL-12 demonstriert werden, sodass eine pro-inflammatorische Immunantwort ausgelöst wird²⁴. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sie zytotoxische natürliche Killerzellen aktivieren und damit eine antitumorale Immunantwort induzieren können²⁵. Insgesamt eignet sich damit diese Zellpopulation auch als Kandidat für die *in vivo* Applikation von Antigenen zur Tumorstimmulierung²⁴.

In den hier erfolgten Experimenten zeigte sich, ähnlich wie bei der Stimulation von iDCs, dass der TLR-Agonist R848 eine CD83-Expression auf allen Zellen förderte. IL-10 konnte den Anteil der CD83⁺ Zellen etwas senken. Eine CD14⁺ Zellpopulation wurde, wie auch erwartet, nicht gebildet. Mit dem Versuch konnte demonstriert werden, dass auch die CD83⁺slan⁺ Zellen einen stabilen Phänotyp zeigen und die Expression von CD86 und CD163 durch IL-10 auf diesem Zelltyp nicht moduliert wurde.

Für eine effiziente DC-Vakzine bedarf es weiterer Forschung, bei der auch dieser Zelltyp mit dem Vorteil der schnellen Kultivierung eine Rolle spielen kann.

5.6 Zusammenfassung

Dendritische Zellen können als antigenpräsentierende Zellen sowohl immunogene als auch tolerogene Funktionen im Immunsystem wahrnehmen und werden in der Therapie von Tumorerkrankungen und Autoimmunerkrankungen eingesetzt. IL-10 gilt als Induktor tolerogener dendritischer Zellen. Diese werden in der Literatur oft als unreif bezeichnet und stehen im Gegensatz zu den reifen immunogenen dendritischen Zellen, die durch die Expression des Reifungsmarkers CD83 gekennzeichnet sind. Ausdifferenzierte dendritische Zellen exprimieren zudem das Antigen CD86, das der T-Zell-Aktivierung dient. Steinbrink et al. und Studien anderer Autoren beschreiben durch den Einfluss von IL-10 eine qualitative Veränderung dendritischer Zellen mit u.a. reduzierter CD83- und CD86-Expression.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von IL-10 auf den Reifungsprozess dendritischer Zellen *in vitro* untersucht. Zur Generierung unreifer dendritischer Zellen wurden humane Monozyten nach etabliertem Protokoll mit IL-4 und GM-CSF stimuliert. Nach anschließender IL-10-Stimulation, insbesondere in Kombination mit einem TLR-Agonisten, bildeten sich zwei exklusive Zellpopulationen: eine CD14⁺ Population und eine CD83⁺ Population. Unreife CD14⁻CD83⁻ dendritische Zellen reexprimierten einerseits CD14 oder exprimierten andererseits CD83. TNF- α wiederum konnte die Ausbildung der CD14⁺ Zellpopulation verhindern. Die CD83⁺ Zellen wurden als reife dendritische Zellen klassifiziert. Dabei zeigte sich, dass das kostimulierende Antigen CD86 gleichermaßen sowohl mit als auch ohne IL-10-Inkubation hoch exprimiert wurde und IL-10 folglich keinen zusätzlichen Einfluss auf dessen Expression hat. Desgleichen wurde die Expression des Antigens ILT4, das die Immuntoleranz fördert, auf den reifen CD83⁺ dendritischen Zelle nicht reguliert. Die CD14⁺ Zellen exprimierten einen vergleichbaren Phänotyp zu M2c-Makrophagen und waren durch eine hohe Expression von CD163 gekennzeichnet. IL-10 konnte die Expression auf dieser Zellpopulation nochmals steigern, sodass hier ein qualitativer Effekt von IL-10 vorlag. Insgesamt jedoch waren Veränderungen bezüglich der Oberflächenantigene, die bei der Betrachtung der Gesamtheit aller Zellen auffallen, auf eine quantitative Verschiebung der beiden Zellpopulationen zurückzuführen. IL-10 beeinflusst also nicht direkt einzelne kostimulierende oder inhibitorische Moleküle (mit wenigen Ausnahmen wie CD163), sondern beeinflusst den Anteil der CD14⁺ Zellen gegenüber den CD83⁺ dendritischen Zellen. Erhöhte Konzentrationen an IL-4 oder GM-CSF, sowie eine längere

Diskussion

Inkubationsdauer, konnten den Phänotyp der beiden Zellpopulationen nicht beeinflussen. Funktionell betrachtet zeigten die CD14⁺ Zellen eine gesteigerte Makropinozytose im Gegensatz zu den reifen CD83⁺ dendritischen Zellen.

Zusammenfassend führt IL-10 zu einer Reexpression von CD14 auf unreifen dendritischen Zellen und aktiviert einen alternativen Differenzierungsweg. Die CD14⁺ Zellen weisen einen stabilen immunregulatorischen Phänotyp auf und unterscheiden sich somit von reifen dendritischen Zellen, die nach Inkubation mit IL-10 nicht reguliert werden. Damit muss die Begrifflichkeit und Klassifikation tolerogener dendritischer Zellen weiter diskutiert werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. IDENTIFICATION OF A NOVEL CELL TYPE IN PERIPHERAL LYMPHOID ORGANS OF MICE. *J. Exp. Med.* **137**, 1142–1162 (1973).
2. Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245–252 (1998).
3. Collin, M., McGovern, N. & Haniffa, M. Human dendritic cell subsets. *Immunology* **140**, 22–30 (2013).
4. Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J. & Mortha, A. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 563–604 (2013).
5. Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis Res.* **4**, S127–S132 (2002).
6. Wilson, N. S., El-Sukkari, D. & Villadangos, J. A. Dendritic cells constitutively present self antigens in their immature state in vivo and regulate antigen presentation by controlling the rates of MHC class II synthesis and endocytosis. *Blood* **103**, 2187–2195 (2004).
7. Zhou, L. J. & Tedder, T. F. CD14⁺ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83⁺ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 2588–2592 (1996).
8. Romani, N. *et al.* Generation of mature dendritic cells from human blood An improved method with special regard to clinical applicability. *J. Immunol. Methods* **196**, 137–151 (1996).
9. Dauer, M. *et al.* Mature Dendritic Cells Derived from Human Monocytes Within 48 Hours: A Novel Strategy for Dendritic Cell Differentiation from Blood Precursors. *J. Immunol.* **170**, 4069–4076 (2003).
10. Pittet, M. J., Nahrendorf, M. & Swirski, F. K. The journey from stem cell to macrophage. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1319**, 1–18 (2014).
11. Mantovani, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* **25**, 677–686 (2004).
12. Fabriek, B. O., Dijkstra, C. D. & van den Berg, T. K. The macrophage scavenger receptor CD163. *Immunobiology* **210**, 153–160 (2005).
13. Murray, P. J. *et al.* Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* **41**, 14–20 (2014).
14. Sulahian, T. H. *et al.* HUMAN MONOCYTES EXPRESS CD163, WHICH IS UPREGULATED BY IL-10 AND IDENTICAL TO p155. *Cytokine* **12**, 1312–1321 (2000).
15. Heuvel, M. M. van den *et al.* Regulation of CD163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation. *J. Leukoc. Biol.* **66**, 858–866 (1999).
16. Ritter, M. *et al.* The Scavenger Receptor CD163: Regulation, Promoter Structure and Genomic Organization. *Pathobiology* **67**, 257–261 (1999).
17. Barros, M. H. M., Hauck, F., Dreyer, J. H., Kempkes, B. & Niedobitek, G. Macrophage Polarisation: an Immunohistochemical Approach for Identifying M1 and M2 Macrophages. *PLOS ONE* **8**, e80908 (2013).
18. Noy, R. & Pollard, J. W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* **41**, 49–61 (2014).
19. Kitamura, T., Qian, B.-Z. & Pollard, J. W. Immune cell promotion of metastasis. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 73–86 (2015).
20. Komohara, Y., Jinushi, M. & Takeya, M. Clinical significance of macrophage

- heterogeneity in human malignant tumors. *Cancer Sci.* **105**, 1–8 (2014).
21. de Baey, A., Mende, I., Riethmueller, G. & Baeuerle, P. A. Phenotype and function of human dendritic cells derived from M-DC8(+) monocytes. *Eur. J. Immunol.* **31**, 1646–1655 (2001).
 22. Schäkel, K. *et al.* A novel dendritic cell population in human blood: one-step immunomagnetic isolation by a specific mAb (M-DC8) and in vitro priming of cytotoxic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **28**, 4084–4093 (1998).
 23. Schäkel, K. *et al.* 6-Sulfo LacNAc, a novel carbohydrate modification of PSGL-1, defines an inflammatory type of human dendritic cells. *Immunity* **17**, 289–301 (2002).
 24. Schäkel, K. *et al.* Human 6-Sulfo LacNAc-Expressing Dendritic Cells Are Principal Producers of Early Interleukin-12 and Are Controlled by Erythrocytes. *Immunity* **24**, 767–777 (2006).
 25. Schmitz, M. *et al.* Tumoricidal potential of native blood dendritic cells: direct tumor cell killing and activation of NK cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **174**, 4127–4134 (2005).
 26. van Leeuwen-Kerkhoff, N. *et al.* Transcriptional profiling reveals functional dichotomy between human slan+non-classical monocytes and myeloid dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* **102**, 1055–1068 (2017).
 27. Jonuleit, H. *et al.* Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur. J. Immunol.* **27**, 3135–3142 (1997).
 28. Ritter, U., Meissner, A., Ott, J. & Körner, H. Analysis of the maturation process of dendritic cells deficient for TNF and lymphotoxin-alpha reveals an essential role for TNF. *J. Leukoc. Biol.* **74**, 216–222 (2003).
 29. Harris, S. G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D. & Phipps, R. P. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol.* **23**, 144–150 (2002).
 30. Scandella, E., Men, Y., Gillessen, S., Förster, R. & Groettrup, M. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **100**, 1354–1361 (2002).
 31. Kaliński, P., Schuitemaker, J. H., Hilkens, C. M. & Kapsenberg, M. L. Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **161**, 2804–2809 (1998).
 32. Sallusto, F. *et al.* Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur. J. Immunol.* **29**, 1617–1625 (1999).
 33. Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol. Rev.* **177**, 134–140 (2000).
 34. Dieu, M. C. *et al.* Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J. Exp. Med.* **188**, 373–386 (1998).
 35. Rubio, M. T. *et al.* Maturation of human monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) in the presence of prostaglandin E2 optimizes CD4 and CD8 T cell-mediated responses to protein antigens: role of PGE2 in chemokine and cytokine expression by MoDCs. *Int. Immunol.* **17**, 1561–1572 (2005).
 36. Wöfl, M. & Greenberg, P. D. Antigen-specific activation and cytokine-facilitated expansion of naive, human CD8 + T cells. *Nat. Protoc.* **9**, 950–966 (2014).
 37. Riquelme, P., Geissler, E. K. & Hutchinson, J. A. Alternative approaches to myeloid suppressor cell therapy in transplantation: comparing regulatory macrophages to tolerogenic DCs and MDSCs. *Transplant. Res.* **1**, 17 (2012).

38. Zhang, W. *et al.* Myeloid-derived suppressor cells in transplantation: the dawn of cell therapy. *J. Transl. Med.* **16**, (2018).
39. Amodio, G. & Gregori, S. Human tolerogenic DC-10: perspectives for clinical applications. *Transplant. Res.* **1**, 14 (2012).
40. Macedo, C., Turquist, H., Metes, D. & Thomson, A. W. Immunoregulatory properties of rapamycin-conditioned monocyte-derived dendritic cells and their role in transplantation. *Transplant. Res.* **1**, 16 (2012).
41. Moreau, A., Varey, E., Bouchet-Delbos, L. & Cuturi, M.-C. Cell therapy using tolerogenic dendritic cells in transplantation. *Transplant. Res.* **1**, 13 (2012).
42. Sun, Z. *et al.* Serum IL-10 from systemic lupus erythematosus patients suppresses the differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *J. Biomed. Res.* **26**, 456–466 (2012).
43. Grütz, G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J. Leukoc. Biol.* **77**, 3–15 (2005).
44. Carey, A. J., Tan, C. K. & Ulett, G. C. Infection-induced IL-10 and JAK-STAT: A review of the molecular circuitry controlling immune hyperactivity in response to pathogenic microbes. *JAK-STAT* **1**, 159–167 (2012).
45. Corinti, S., Albanesi, C., la Sala, A., Pastore, S. & Girolomoni, G. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **166**, 4312–4318 (2001).
46. Wehinger, J. *et al.* IL-10 induces DNA binding activity of three STAT proteins (Stat1, Stat3, and Stat5) and their distinct combinatorial assembly in the promoters of selected genes. *FEBS Lett.* **394**, 365–370 (1996).
47. Antoniv, T. T. & Ivashkiv, L. B. Interleukin-10-induced gene expression and suppressive function are selectively modulated by the PI3K-Akt-GSK3 pathway. *Immunology* **132**, 567–577 (2011).
48. Commeren, D. L. *et al.* Paradoxical effects of interleukin-10 on the maturation of murine myeloid dendritic cells. *Immunology* **110**, 188–196 (2003).
49. Mocellin, S., Marincola, F. M. & Young, H. A. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *J. Leukoc. Biol.* **78**, 1043–1051 (2005).
50. Steinbrink, K., Wöfl, M., Jonuleit, H., Knop, J. & Enk, A. H. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J. Immunol.* **159**, 4772–4780 (1997).
51. Allavena, P. *et al.* IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur. J. Immunol.* **28**, 359–369 (1998).
52. Ancuta, P., Weiss, L. & Haeffner-Cavaillon, N. CD14⁺CD16⁺⁺ cells derived in vitro from peripheral blood monocytes exhibit phenotypic and functional dendritic cell-like characteristics. *Eur. J. Immunol.* **30**, 1872–1883 (2000).
53. Li, G., Hangoc, G. & Broxmeyer, H. E. Interleukin-10 in combination with M-CSF and IL-4 contributes to development of the rare population of CD14⁺CD16⁺⁺ cells derived from human monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**, 637–643 (2004).
54. Velten, F. W., Duperrier, K., Bohlender, J., Metharom, P. & Goerdts, S. A gene signature of inhibitory MHC receptors identifies a BDCA3(+) subset of IL-10-induced dendritic cells with reduced allostimulatory capacity in vitro. *Eur. J. Immunol.* **34**, 2800–2811 (2004).
55. Gregori, S. *et al.* Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood* **116**, 935–944 (2010).
56. Locafaro, G. *et al.* HLA-G expression on blasts and tolerogenic cells in patients affected by acute myeloid leukemia. *J. Immunol. Res.* **2014**, 636292 (2014).

57. Comi, M., Amodio, G. & Gregori, S. Interleukin-10-Producing DC-10 Is a Unique Tool to Promote Tolerance Via Antigen-Specific T Regulatory Type 1 Cells. *Front. Immunol.* **9**, 682 (2018).
58. Timmerman, J. M. & Levy, R. Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Annu. Rev. Med.* **50**, 507–529 (1999).
59. Kalinski, P., Muthuswamy, R. & Urban, J. Dendritic cells in cancer immunotherapy: vaccines and combination immunotherapies. *Expert Rev. Vaccines* **12**, 285–295 (2013).
60. Guo, C. *et al.* Therapeutic Cancer Vaccines: Past, Present and Future. *Adv. Cancer Res.* **119**, 421–475 (2013).
61. Hsu, F. J. *et al.* Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* **2**, 52–58 (1996).
62. Nestle, F. O. *et al.* Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* **4**, 328–332 (1998).
63. Thurner, B. *et al.* Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J. Exp. Med.* **190**, 1669–1678 (1999).
64. Boudewijns, S. *et al.* Autologous monocyte-derived DC vaccination combined with cisplatin in stage III and IV melanoma patients: a prospective, randomized phase 2 trial. *Cancer Immunol. Immunother.* **69**, 477–488 (2020).
65. Tarbell, K. V. *et al.* Dendritic cell-expanded, islet-specific CD4⁺ CD25⁺ CD62L⁺ regulatory T cells restore normoglycemia in diabetic NOD mice. *J. Exp. Med.* **204**, 191–201 (2007).
66. Steinman, R. M., Hawiger, D. & Nussenzweig, M. C. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 685–711 (2003).
67. Trombetta, E. S. & Mellman, I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 975–1028 (2005).
68. Steinman, R. M. & Banchereau, J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* **449**, 419–426 (2007).
69. Palucka, K. & Banchereau, J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 265–277 (2012).
70. Palucka, K. & Banchereau, J. Dendritic cell-based cancer therapeutic vaccines. *Immunity* **39**, 38–48 (2013).
71. Aarntzen, E. H. J. G., Figdor, C. G., Adema, G. J., Punt, C. J. A. & de Vries, I. J. M. Dendritic cell vaccination and immune monitoring. *Cancer Immunol. Immunother.* **57**, 1559–1568 (2008).
72. Schuler, G. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Eur. J. Immunol.* **40**, 2123–2130 (2010).
73. Müller, G. *et al.* Interleukin-10-Treated Dendritic Cells Modulate Immune Responses of Naive and Sensitized T Cells In Vivo. *J. Invest. Dermatol.* **119**, 836–841 (2002).
74. Schülke, S. Induction of Interleukin-10 Producing Dendritic Cells As a Tool to Suppress Allergen-Specific T Helper 2 Responses. *Front. Immunol.* **9**, 455 (2018).
75. Kryczanowsky, F., Raker, V., Graulich, E., Domogalla, M. P. & Steinbrink, K. IL-10-Modulated Human Dendritic Cells for Clinical Use: Identification of a Stable and Migratory Subset with Improved Tolerogenic Activity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **197**, 3607–3617 (2016).
76. Chitta, S., Santambrogio, L. & Stern, L. J. GM-CSF in the absence of other cytokines sustains human dendritic cell precursors with T cell regulatory activity and capacity to differentiate into functional dendritic cells. *Immunol. Lett.* **116**, 41–54 (2008).

77. Torres-Aguilar, H. *et al.* Tolerogenic Dendritic Cells Generated with Different Immunosuppressive Cytokines Induce Antigen-Specific Anergy and Regulatory Properties in Memory CD4⁺ T Cells. *J. Immunol.* **184**, 1765–1775 (2010).
78. Xu, H., Krämer, M., Spengler, H. P. & Peters, J. H. Dendritic cells differentiated from human monocytes through a combination of IL-4, GM-CSF and IFN-gamma exhibit phenotype and function of blood dendritic cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **378**, 75–78 (1995).
79. Chapuis, F. *et al.* Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur. J. Immunol.* **27**, 431–441 (1997).
80. Gieseler, R., Heise, D., Soruri, A., Schwartz, P. & Peters, J. H. In-vitro differentiation of mature dendritic cells from human blood monocytes. *Dev. Immunol.* **6**, 25–39 (1998).
81. Ahonen, C. L. *et al.* Dendritic Cell Maturation and Subsequent Enhanced T-Cell Stimulation Induced with the Novel Synthetic Immune Response Modifier R-848. *Cell. Immunol.* **197**, 62–72 (1999).
82. Assier, E. *et al.* TLR7/8 agonists impair monocyte-derived dendritic cell differentiation and maturation. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 221–228 (2007).
83. Brunner, C. *et al.* Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **165**, 6278–6286 (2000).
84. Boks, M. A. *et al.* IL-10-generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction--a comparative study of human clinical-applicable DC. *Clin. Immunol. Orlando Fla* **142**, 332–342 (2012).
85. Rosenberg, S. A., Yang, J. C. & Restifo, N. P. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat. Med.* **10**, 909–915 (2004).
86. Landmann, R., Müller, B. & Zimmerli, W. CD14, new aspects of ligand and signal diversity. *Microbes Infect.* **2**, 295–304 (2000).
87. Ruppert, J., Schütt, C., Ostermeier, D. & Peters, J. H. Down-regulation and release of CD14 on human monocytes by IL-4 depends on the presence of serum or GM-CSF. *Adv. Exp. Med. Biol.* **329**, 281–286 (1993).
88. Boltjes, A. & van Wijk, F. Human dendritic cell functional specialization in steady-state and inflammation. *Front. Immunol.* **5**, 131 (2014).
89. Collin, M. & Bigley, V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology* **154**, 3–20 (2018).
90. Villani, A.-C. *et al.* Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes and progenitors. *Science* **356**, (2017).
91. Yin, X. *et al.* Human Blood CD1c⁺ Dendritic Cells Encompass CD5^{high} and CD5^{low} Subsets That Differ Significantly in Phenotype, Gene Expression, and Functions. *J. Immunol.* **198**, 1553–1564 (2017).
92. Beitnes, A.-C. R. *et al.* Rapid Accumulation of CD14⁺CD11c⁺ Dendritic Cells in Gut Mucosa of Celiac Disease after in vivo Gluten Challenge. *PLoS ONE* **7**, (2012).
93. Segura, E. *et al.* Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity* **38**, 336–348 (2013).
94. Muñoz, S. M. & Rodríguez, L. S. Dendritic cells generated in the presence of vitamin D3 and stimulated with lipopolysaccharide secrete IL-8, IL-1 β , IL-10 and induce relatively low levels of CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ T cells. *Biomed. Rev. Inst. Nac. Salud* **36**, 239–250 (2016).
95. Holla, S. *et al.* GM-CSF along with IL-4 but not alone is indispensable for the differentiation of human dendritic cells from monocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* **133**, 1500-1502.e1 (2014).
96. Jakubzick, C. *et al.* Minimal differentiation of classical monocytes as they

- survey steady state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity* **39**, (2013).
97. Tu, L., Chen, J., Zhang, H. & Duan, L. Interleukin-4 Inhibits Regulatory T Cell Differentiation through Regulating CD103+ Dendritic Cells. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
98. Gilboa, E. DC-based cancer vaccines. *J. Clin. Invest.* **117**, 1195–1203 (2007).
99. Bol, K. F., Schreibelt, G., Gerritsen, W. R., Vries, I. J. M. de & Figdor, C. G. Dendritic Cell–Based Immunotherapy: State of the Art and Beyond. *Clin. Cancer Res.* **22**, 1897–1906 (2016).
100. Bürdek, M. *et al.* Three-day dendritic cells for vaccine development: Antigen uptake, processing and presentation. *J. Transl. Med.* **8**, 90 (2010).
101. Sander, J. *et al.* Cellular Differentiation of Human Monocytes Is Regulated by Time-Dependent Interleukin-4 Signaling and the Transcriptional Regulator NCOR2. *Immunity* **47**, 1051-1066.e12 (2017).
102. Wu, X., Xu, F., Liu, J. & Wang, G. Comparative study of dendritic cells matured by using IL-1 β , IL-6, TNF- α and prostaglandins E2 for different time span. *Exp. Ther. Med.* **14**, 1389–1394 (2017).
103. Hart, K., Byrne, K., Molloy, M., Usherwood, E. & Berwin, B. IL-10 Immunomodulation of Myeloid Cells Regulates a Murine Model of Ovarian Cancer. *Front. Immunol.* **2**, (2011).
104. Lee, J.-J. *et al.* The Role of PGE2 in the Differentiation of Dendritic Cells: How Do Dendritic Cells Influence T-Cell Polarization and Chemokine Receptor Expression? *STEM CELLS* **20**, 448–459 (2002).
105. Brencicova, E. *et al.* Interleukin-10 and prostaglandin E2 have complementary but distinct suppressive effects on Toll-like receptor-mediated dendritic cell activation in ovarian carcinoma. *PLoS ONE* **12**, (2017).
106. Svensson-Arvelund, J. *et al.* The Human Fetal Placenta Promotes Tolerance against the Semiallogeneic Fetus by Inducing Regulatory T Cells and Homeostatic M2 Macrophages. *J. Immunol.* **194**, 1534–1544 (2015).
107. Fabriek, B. O. *et al.* The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood* **113**, 887–892 (2009).
108. Zizzo, G., Hilliard, B. A., Monestier, M. & Cohen, P. L. Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires “M2c” polarization and MerTK induction. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **189**, 3508–3520 (2012).
109. Spiller, K. L. *et al.* The Role of Macrophage Phenotype in Vascularization of Tissue Engineering Scaffolds. *Biomaterials* **35**, 4477–4488 (2014).
110. Nazarkina, Zh. K., Zajakina, A. & Laktionov, P. P. Maturation and Antigen Loading Protocols Influence Activity of Anticancer Dendritic Cells. *Mol. Biol.* **52**, 222–231 (2018).
111. Lolmede, K. *et al.* Inflammatory and alternatively activated human macrophages attract vessel-associated stem cells, relying on separate HMGB1- and MMP-9-dependent pathways. *J. Leukoc. Biol.* **85**, 779–787 (2009).
112. Mommert, S. *et al.* Histamine H2 receptor stimulation upregulates TH2 chemokine CCL17 production in human M2a macrophages. *J. Allergy Clin. Immunol.* **141**, 782-785.e5 (2018).
113. Collin, M. & Bigley, V. Monocyte, Macrophage, and Dendritic Cell Development: the Human Perspective. *Microbiol. Spectr.* **4**, (2016).
114. Lindenberg, J. J., Fehres, C. M., van Crujisen, H., Oosterhoff, D. & de Gruijl, T. D. Cross-talk between tumor and myeloid cells: how to tip the balance in favor of antitumor immunity. *Immunotherapy* **3**, 77–96 (2011).
115. Gabrilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S. & Bronte, V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 253–268 (2012).
116. Heusinkveld, M. *et al.* M2 Macrophages Induced by Prostaglandin E2 and IL-6

- from Cervical Carcinoma Are Switched to Activated M1 Macrophages by CD4⁺ Th1 Cells. *J. Immunol.* **187**, 1157–1165 (2011).
117. Oosterhoff, D. *et al.* Tumor-mediated inhibition of human dendritic cell differentiation and function is consistently counteracted by combined p38 MAPK and STAT3 inhibition. *Oncoimmunology* **1**, 649–658 (2012).
118. Sombroek, C. C. *et al.* Prostanoids Play a Major Role in the Primary Tumor-Induced Inhibition of Dendritic Cell Differentiation. *J. Immunol.* **168**, 4333–4343 (2002).
119. Obermajer, N., Muthuswamy, R., Lesnock, J., Edwards, R. P. & Kalinski, P. Positive feedback between PGE₂ and COX2 redirects the differentiation of human dendritic cells toward stable myeloid-derived suppressor cells. *Blood* **118**, 5498–5505 (2011).
120. Chen, F., Hou, M., Ye, F., Lv, W. & Xie, X. Ovarian cancer cells induce peripheral mature dendritic cells to differentiate into macrophagelike cells in vitro. *Int. J. Gynecol. Cancer Off. J. Int. Gynecol. Cancer Soc.* **19**, 1487–1493 (2009).
121. Lindenberg, J. J. *et al.* Functional characterization of a STAT3-dependent dendritic cell-derived CD14⁺ cell population arising upon IL-10-driven maturation. *Oncoimmunology* **2**, (2013).
122. Wimmers, F., Schreibelt, G., Sköld, A. E., Figdor, C. G. & De Vries, I. J. M. Paradigm Shift in Dendritic Cell-Based Immunotherapy: From in vitro Generated Monocyte-Derived DCs to Naturally Circulating DC Subsets. *Front. Immunol.* **5**, 165 (2014).
123. Banchereau, J. *et al.* Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 767–811 (2000).
124. Gustafson, M. P. *et al.* Intratumoral CD14⁺ Cells and Circulating CD14⁺HLA-DR^{lo}/neg Monocytes Correlate with Decreased Survival in Patients with Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **21**, 4224–4233 (2015).
125. Gustafson, M. P. *et al.* Association of an increased frequency of CD14⁺HLA-DR^{lo}/neg monocytes with decreased time to progression in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Br. J. Haematol.* **156**, 674–676 (2012).
126. Lin, Y. *et al.* Immunosuppressive CD14⁺HLA-DR^{low}/– monocytes in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* **117**, 872–881 (2011).
127. Gustafson, M. P. *et al.* Systemic immune suppression in glioblastoma: the interplay between CD14⁺HLA-DR^{lo}/neg monocytes, tumor factors, and dexamethasone. *Neuro-Oncol.* **12**, 631–644 (2010).
128. Mengos, A. E., Gastineau, D. A. & Gustafson, M. P. The CD14⁺HLA-DR^{lo}/neg Monocyte: An Immunosuppressive Phenotype That Restrains Responses to Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
129. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* **179**, 1109–1118 (1994).
130. Robbins, S. H. *et al.* Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol.* **9**, R17 (2008).
131. Serbina, N. V., Salazar-Mather, T. P., Biron, C. A., Kuziel, W. A. & Pamer, E. G. TNF/iNOS-Producing Dendritic Cells Mediate Innate Immune Defense against Bacterial Infection. *Immunity* **19**, 59–70 (2003).
132. Geissmann, F. *et al.* Retinoids Regulate Survival and Antigen Presentation by Immature Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* **198**, 623–634 (2003).
133. Günther, C., Starke, J., Zimmermann, N. & Schäkel, K. Human 6-sulfo LacNAc (slan) dendritic cells are a major population of dermal dendritic cells in steady state and

- inflammation. *Clin. Exp. Dermatol.* **37**, 169–176 (2012).
134. Döbel, T. & Schäkel, K. Die Bedeutung von humanen 6-sulfo LacNAc dendritischen Zellen (slanDCs) bei Autoimmunität und Tumorerkrankungen. *JDDG J. Dtsch. Dermatol. Ges.* **12**, 874–880 (2014).
135. Alferink, J. *et al.* Compartmentalized Production of CCL17 In Vivo. *J. Exp. Med.* **197**, 585–599 (2003).
136. Stutte, S. *et al.* Requirement of CCL17 for CCR7- and CXCR4-dependent migration of cutaneous dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 8736–8741 (2010).
137. Ruland, C. *et al.* Chemokine CCL17 is expressed by dendritic cells in the CNS during experimental autoimmune encephalomyelitis and promotes pathogenesis of disease. *Brain. Behav. Immun.* **66**, 382–393 (2017).
138. Achuthan, A. *et al.* Granulocyte macrophage colony-stimulating factor induces CCL17 production via IRF4 to mediate inflammation. *J. Clin. Invest.* **126**, 3453–3466.
139. Lee, M.-C. *et al.* CCL17 blockade as a therapy for osteoarthritis pain and disease. *Arthritis Res. Ther.* **20**, 62 (2018).
140. Riol-Blanco, L. *et al.* The Chemokine Receptor CCR7 Activates in Dendritic Cells Two Signaling Modules That Independently Regulate Chemotaxis and Migratory Speed. *J. Immunol.* **174**, 4070–4080 (2005).
141. Guha, M. & Mackman, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal.* **13**, 85–94 (2001).
142. Nagarajan, S. *et al.* Ligand Binding and Phagocytosis by CD16 (Fc γ Receptor III) Isoforms PHAGOCYTOTIC SIGNALING BY ASSOCIATED ζ AND γ SUBUNITS IN CHINESE HAMSTER OVARY CELLS. *J. Biol. Chem.* **270**, 25762–25770 (1995).
143. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* **155**, 1151–1164 (1995).
144. Moore, K. J. *et al.* A CD36-initiated Signaling Cascade Mediates Inflammatory Effects of β -Amyloid. *J. Biol. Chem.* **277**, 47373–47379 (2002).
145. El Khoury, J. B. *et al.* CD36 Mediates the Innate Host Response to β -Amyloid. *J. Exp. Med.* **197**, 1657–1666 (2003).
146. Pennathur, S. *et al.* The Macrophage Phagocytic Receptor CD36 Promotes Fibrogenic Pathways on Removal of Apoptotic Cells during Chronic Kidney Injury. *Am. J. Pathol.* **185**, 2232–2245 (2015).
147. McLellan, A. D., Sorg, R. V., Williams, L. A. & Hart, D. N. Human dendritic cells activate T lymphocytes via a CD40: CD40 ligand-dependent pathway. *Eur. J. Immunol.* **26**, 1204–1210 (1996).
148. Bhatia, S., Edidin, M., Almo, S. C. & Nathenson, S. G. B7-1 and B7-2: Similar costimulatory ligands with different biochemical, oligomeric and signaling properties. *Immunol. Lett.* **104**, 70–75 (2006).
149. Aerts-Toegaert, C. *et al.* CD83 expression on dendritic cells and T cells: Correlation with effective immune responses. *Eur. J. Immunol.* **37**, 686–695 (2007).
150. Chang, C. C. *et al.* Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat. Immunol.* **3**, 237–243 (2002).
151. Cella, M. *et al.* A Novel Inhibitory Receptor (ILT3) Expressed on Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells Involved in Antigen Processing. *J. Exp. Med.* **185**, 1743–1751 (1997).
152. Sansom, D. M. CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom? *Immunology* **101**, 169–177 (2000).
153. Boucher, P. & Herz, J. Signaling through LRP1: Protection from atherosclerosis

- and beyond. *Biochem. Pharmacol.* **81**, 1–5 (2011).
154. Derocq, D. *et al.* Cathepsin D is partly endocytosed by the LRP1 receptor and inhibits LRP1-regulated intramembrane proteolysis. *Oncogene* **31**, 3202–3212 (2012).
155. Yahiro, K. *et al.* Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein-1 (LRP1) Mediates Autophagy and Apoptosis Caused by Helicobacter pylori VacA. *J. Biol. Chem.* **287**, 31104–31115 (2012).
156. Yancey, P. G. *et al.* Macrophage LRP1 Controls Plaque Cellularity By Regulating Efferocytosis and Akt Activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 787–795 (2010).
157. Vakkila, J., Lotze, M. T., Riga, C. & Jaffe, R. A basis for distinguishing cultured dendritic cells and macrophages in cytopins and fixed sections. *Pediatr. Dev. Pathol. Off. J. Soc. Pediatr. Pathol. Paediatr. Pathol. Soc.* **8**, 43–51 (2005).
158. Shiraishi, D. *et al.* CD163 Is Required for Protumoral Activation of Macrophages in Human and Murine Sarcoma. *Cancer Res.* **78**, 3255–3266 (2018).
159. Yanagihara, S., Komura, E., Nagafune, J., Watarai, H. & Yamaguchi, Y. EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **161**, 3096–3102 (1998).
160. Platt, N. & Gordon, S. Is the class A macrophage scavenger receptor (SR-A) multifunctional? — The mouse's tale. *J. Clin. Invest.* **108**, 649–654 (2001).
161. Komohara, Y., Ohnishi, K., Kuratsu, J. & Takeya, M. Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *J. Pathol.* **216**, 15–24 (2008).
162. Ichimura, T. *et al.* Prognostic significance of CD204-positive macrophages in upper urinary tract cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **21**, 2105–2112 (2014).
163. Stahl, P. D. & Ezekowitz, R. A. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 50–55 (1998).
164. Ferrante, C. J. *et al.* The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of Interleukin-4 receptor alpha (IL4R α) signaling. *Inflammation* **36**, 921–931 (2013).
165. Dupasquier Marcel *et al.* The dermal microenvironment induces the expression of the alternative activation marker CD301/mMGL in mononuclear phagocytes, independent of IL-4/IL-13 signaling. *J. Leukoc. Biol.* **80**, 838–849 (2006).
166. Lee, S. J. *et al.* Mannose Receptor-Mediated Regulation of Serum Glycoprotein Homeostasis. *Science* **295**, 1898–1901 (2002).
167. Aarnoudse, C. A., Vallejo, J. J. G., Saeland, E. & van Kooyk, Y. Recognition of tumor glycans by antigen-presenting cells. *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 105–111 (2006).
168. Tseng, S.-Y. *et al.* B7-Dc, a New Dendritic Cell Molecule with Potent Costimulatory Properties for T Cells. *J. Exp. Med.* **193**, 839–846 (2001).
169. Wang, S. *et al.* Molecular Modeling and Functional Mapping of B7-H1 and B7-DC Uncouple Costimulatory Function from PD-1 Interaction. *J. Exp. Med.* **197**, 1083–1091 (2003).
170. Dong, H., Zhu, G., Tamada, K. & Chen, L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat. Med.* **5**, 1365–1369 (1999).
171. Sage, P. T. *et al.* Dendritic Cell PD-L1 Limits Autoimmunity and Follicular T Cell Differentiation and Function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **200**, 2592–2602 (2018).
172. Schütz, F. & Hackstein, H. Identification of novel dendritic cell subset markers in human blood. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **443**, 453–457 (2014).
173. Chapoval, A. I. *et al.* B7-H3: A costimulatory molecule for T cell activation and IFN- γ production. *Nat. Immunol.* **2**, ni0301_269 (2001).

174. Latchman, Y. *et al.* PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.* **2**, 261–268 (2001).
175. Zhang, J. & Patel, J. M. Role of the CX3CL1-CX3CR1 axis in chronic inflammatory lung diseases. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **3**, 233–244 (2010).
176. Li, L. *et al.* The chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 mediate monocyte/macrophage trafficking in kidney ischemia–reperfusion injury. *Kidney Int.* **74**, 1526–1537 (2008).
177. Ishida, Y., Gao, J.-L. & Murphy, P. M. Chemokine Receptor CX3CR1 Mediates Skin Wound Healing by Promoting Macrophage and Fibroblast Accumulation and Function. *J. Immunol.* **180**, 569–579 (2008).
178. Panek, C. A. *et al.* Differential expression of the fractalkine chemokine receptor (CX3CR1) in human monocytes during differentiation. *Cell. Mol. Immunol.* **12**, 669–680 (2015).
179. Jones, S. A. Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6. *J. Immunol.* **175**, 3463–3468 (2005).
180. Tang, M. *et al.* Toll-like Receptor 2 Activation Promotes Tumor Dendritic Cell Dysfunction by Regulating IL-6 and IL-10 Receptor Signaling. *Cell Rep.* **13**, 2851–2864 (2015).
181. Lesina, M. *et al.* Stat3/Socs3 Activation by IL-6 Transsignaling Promotes Progression of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia and Development of Pancreatic Cancer. *Cancer Cell* **19**, 456–469 (2011).
182. Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J. & Palucka, A. K. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat. Immunol.* **1**, 510–514 (2000).
183. Zhou, J. *et al.* Myeloid STAT3 promotes lung tumorigenesis by transforming tumor immunosurveillance into tumor-promoting inflammation. *Cancer Immunol. Res.* **5**, 257–268 (2017).

7 Glossar

CCL17 (TARC)

Das Chemokin CCL17, auch *thymus and activation-regulated chemokine* (TARC) genannt, dient als Chemoattraktans verschiedener T-Zell-Populationen¹³⁵. CCL17 wurde ursprünglich den M2-Makrophagen zugeordnet, wird aber auch von bestimmten dendritischen Zellen produziert^{136,137}. Achuthan et al. konnten zeigen, dass GM-CSF eine erhöhte Produktion des Zytokins u.a. in humanen Monozyten bedingt¹³⁸. Es spielt bei inflammatorischen Prozessen, u.a. bei Osteoarthritis, eine wichtige Rolle, sodass eine Blockade des Zytokins oder seines Signalweges ein möglicher Therapieansatz bei Entzündungsprozessen sein kann.

CCR7

Die Aktivierung von dendritischen Zellen im peripheren Gewebe induziert die CCR7-Expression. Dieser Rezeptor erkennt CCL19 und CCL21 und erhöht die Expression von kostimulierenden Molekülen (B7) sowie MHC I und II¹⁴⁰.

CD14

CD14 ist ein Glykoprotein, das sowohl in löslicher als auch membrangebundener Form vorkommt und zusammen mit den Rezeptoren TLR4 und MD-2 den Lipopolysaccharid-Rezeptor bildet¹⁴¹.

In vitro generierte dendritische Zellen bilden im reifen Zustand kein CD14 mehr aus, wodurch sie sich von Makrophagen unterscheiden. In der vorliegenden Arbeit gilt CD14 als Differenzierungsmarker einer Subpopulation.

CD16

Die Expression findet vor allem auf Makrophagen statt. Der Rezeptor dient der Phagozytose und antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität¹⁴².

CD25 (IL2RA):

Der IL-2-Rezeptor ist ein Transmembranprotein auf aktivierten T-Lymphozyten und regulatorischen T-Zellen¹⁴³.

CD36

Das Oberflächenantigen wird sowohl von Monozyten als auch Makrophagen gebildet und ist an der Phagozytose apoptotischer Zellen beteiligt. Daneben ist der Rezeptor bei der Beseitigung von Zelltrümmern von Relevanz und ist somit wichtig für die Reparatur von Gewebe und der Kontrolle einer Inflammation^{144,145}. Pennathur et al. ordnen diesen Marker den profibrotischen M2-Markern zu¹⁴⁶.

CD40

Über diesen Rezeptor, der von dendritischen Zellen exprimiert wird, werden durch Bindung von CD154 (CD40L) T-Zellen aktiviert¹⁴⁷.

CD80 (B7-1)

CD80 ist ein kostimulierender Ligand von CD28/CLTA4, welcher T-Zellen stimuliert¹⁴⁸.

CD83

Der Marker zeigt sich deutlich auf reifen dendritischen Zellen, aber auch auf aktivierten B-Zellen und T-Zellen¹⁴⁹. Er ist Teil des angeborenen Immunsystems und wirkt modulierend auf die Immunantwort. In der Arbeit definiert er reife dendritische Zellen.

CD85d (ILT4)

Das *immunoglobulin-like transcript 4* (ILT4) ist ein Rezeptor, der Immuntoleranz vermittelt und sowohl von Monozyten als auch von dendritischen Zellen exprimiert wird¹⁵⁰.

CD85k (ILT3)

Das *immunoglobulin-like transcript 3* (ILT3) ist ein inhibitorischer Rezeptor und wird sowohl von dendritischen Zellen als auch von Makrophagen und Monozyten exprimiert¹⁵¹. Er inhibiert die Immunantwort, wofür tolerogene dendritische Zellen verantwortlich gemacht werden.

CD86 (B7-2)

Dieser Oberflächenmarker ist ein CD28/CLTA4-CR Ligand und dient somit der Aktivierung von T-Zellen¹⁴⁸. Im Gegensatz zu CD80 wird dieser schneller und zahlreicher auf dendritischen Zellen exprimiert¹⁵².

CD91 (LRP1)

Der Oberflächenmarker CD91, auch *low-density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1), ist ein Membranrezeptor auf Makrophagen, der mit inflammatorischen Signalen und Efferozytose, ein Prozess phagozytierender Zellen, verknüpft ist¹⁵³. Ein Mangel dieses Rezeptors beeinträchtigt sowohl Efferozytose als auch Phagozytose von Makrophagen *in vivo* und *in vitro*¹⁵⁴⁻¹⁵⁶.

CD163

Der Rezeptor gehört zur Gruppe der Scavenger Rezeptoren, genauer zu den *scavenger receptor cysteine-rich* (SRCR) und wird vor allem von Makrophagen exprimiert¹². Damit unterscheidet dieser Marker zwischen Makrophagen und dendritischen Zellen¹⁵⁷. CD163⁺ Makrophagen sind in der Entwicklung und Progression von Tumoren beteiligt¹⁵⁸.

CD197 (CCR7)

CCR7 stimuliert die Reifung dendritischer Zellen. Der Rezeptor erkennt die Liganden CCL19 und CCL21 und dient der Expression von kostimulierenden Molekülen aus der B7-Gruppe sowie MHC I und MHC II¹⁵⁹.

CD204

CD204 ist ein weiterer sog. *scavenger receptor*¹⁶⁰. Makrophagen, die diesen Rezeptor exprimieren, werden den M2-Makrophagen zugeordnet¹⁶¹. Eine hohe Anzahl CD204-positiver Tumor-assoziiierter Makrophagen (TAM) sind mit einer schlechten Prognose bezüglich des Tumors verknüpft¹⁶².

CD206 (Mannose receptor, MMR)

Das C-type-Lectin spielt bei der Antigenpräsentation eine entscheidende Rolle, vermittelt Phagozytose sowie Endozytose und führt bei dendritischen Zellen zur Zytokinproduktion¹⁶³.

Des Weiteren wird der Marker auf M2-Makrophagen exprimiert¹⁶⁴. Seine Expression wird u.a. durch IL-4, GM-CSF oder durch IL-4-unabhängige Signalwege reguliert¹⁶⁵. Auch wenn die Funktion von CD206 noch nicht vollständig verstanden ist, konnten Lee et al. zeigen, dass der Mannoserezeptor an der Homöostase inflammatorischer Moleküle im Blut beteiligt ist und diese beseitigt¹⁶⁶. Dezydiale Makrophagen, die CD206

exprimieren, sezernieren IL-10 und CCL18 und scheinen für die Toleranz des Fetus gegenüber der mütterlichen Plazenta mitverantwortlich zu sein¹⁰⁶.

CD209 (DC-SIGN)

Dieser C-type lectin Rezeptor (CLR) befindet sich auf Makrophagen und dendritischen Zellen, erkennt PAMPS und aktiviert bei Bindung Phagozytose und interagiert mit T-Zellen. Besonders ist seine Stellung in der Tumorstimmulierung¹⁶⁷.

CD273 (PD-L2, B7-DC)

B7-DC wird von dendritischen Zellen exprimiert und fördert die Proliferation von T-Zellen und die Interferon- γ -Sekretion¹⁶⁸. Des Weiteren dient er als Ligand für PD-1 (CD279)¹⁶⁹.

CD274 (PD-L1, B7-H1)

Das Transmembranprotein ist Teil der B7-Familie und wird unter anderem von aktivierten dendritischen Zellen exprimiert. Es stimuliert u.a. die IL-10-Sekretion¹⁷⁰. Auf dendritischen Zellen trägt es zur tolerogenen Immunlage bei und verhindert eine Ausdifferenzierung von follikulären T-Helferzellen und follikulären regulatorischen Zellen¹⁷¹. B7-H1 ist ein weiterer Ligand von PD-1¹⁶⁹.

CD275

CD275 wird durch IL-4 heraufreguliert. Er definiert unter anderem eine mDC2¹⁷².

CD276 (B7-H3)

Der Marker gehört zu der kostimulierenden B7-Gruppe und dient der Aktivierung von T-Zellen¹⁷³.

CD279 (PD-1)

PD-1 ist ein Oberflächenrezeptor, der eine wichtige Rolle in der Immunsuppression und Selbsttoleranz spielt¹⁷⁴. Er wird u.a. von T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen exprimiert. Seine zwei Liganden sind PD-L1 und PD-L2, welche sich auf der Oberfläche von dendritischen Zellen befinden.

CX₃CR₁

Dieser Rezeptor wird nicht nur von Makrophagen exprimiert, sondern auch von Monozyten, dendritischen Zellen, natürlichen Killerzellen und T-Zellen¹⁷⁵. Seine biologische Funktion im Körper ist die Kontrolle der Migration und Rekrutierung von Effektorzellen bei Entzündungen. Außerdem spielt der Rezeptor bei Krebserkrankungen eine Rolle, da er sowohl Wachstum als auch Metastasen reguliert und dem Tumor einer Immunantwort entziehen kann¹⁷⁵⁻¹⁷⁷.

Sein Ligand Fraktaline aktiviert dendritische Zellen und induziert T-Zell-abhängige Immunität gegenüber einem Tumor. Panek et al. zeigten, dass der Rezeptor auf Makrophagen höher exprimiert wird als auf dendritischen Zellen¹⁷⁸.

HLA-DR (Human Leukocyte Antigen – antigen D related)

Dieser Zelloberflächenrezeptor gehört zur Klasse MHC II und bildet zusammen mit einem Protein einen Liganden für den T-Zell-Rezeptor. In erster Linie werden mit diesem Rezeptor Antigene präsentiert um eine T-Zell-Antwort auszulösen.

IL-6

IL-6 ist ein inflammatorisches Zytokin, das sowohl die angeborene als auch die erworbene Immunantwort reguliert¹⁷⁹. Es wird neben Tumorzellen u.a. von myeloiden Zellen wie Makrophagen oder dendritischen Zellen sezerniert^{180,181}. Chomarat et al. konnten zeigen, dass IL-6 die Differenzierung von Monozyten vermehrt in Richtung Makrophagen stimuliert⁸⁷. Interessanterweise werden M2-Makrophagen gefördert, wodurch letztendlich eine effektive anti-tumorale Antwort reduziert wird¹⁸³.

Danksagung

Aus Datenschutzgründen wird die Danksagung in der elektronischen Form der Arbeit nicht aufgeführt.

Veröffentlichungen

Wissenschaftliche Originalarbeiten

Krakow, S., Crescimone, M. L., Bartels, C., Wiegering, V., Eyrich, M., Schlegel, P. G., & Wöfl, M. (2019). Re-expression of CD14 in Response to a Combined IL-10/TLR Stimulus Defines Monocyte-Derived Cells With an Immunoregulatory Phenotype. *Frontiers in immunology*, *10*, 1484.

Posterpräsentationen

Krakow, S., Reiß, M. L., Bartels, C., Wöfl, M. (2018). IL-10-treated and TLR-activated monocyte-derived dendritic cells differentiate into a macrophage-like subset. *Translational Immunology – From Target to Therapy*, Würzburg 2018

Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Form der Arbeit nicht aufgeführt.