

**Zusammenfassung von fünf Originalarbeiten**

**ZUR**

*kumulativen Habilitation*

**im Fachbereich Medizin**

**der Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

**Titel:**

**Charakterisierung verschiedener Reifungsstadien humaner  
dendritischer Zellen und ihr Einfluss  
auf die T-Zelldifferenzierung**

**eingereicht von:**

**Dr. Helmut Jonuleit**

**im Juni 2001**

**Diese Zusammenfassung bezieht sich auf folgende Originalarbeiten:**

1. **Jonuleit, H., U. Kühn, G. Müller, K. Steinbrink, L. Paragnik, E. Schmitt, J. Knop, and A.H. Enk** 1997. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* 27:3135.
2. **Jonuleit, H., A. Giesecke, A. Kandemir, L. Paragnik, J. Knop, and A.H. Enk** 2000. Induction of tumor peptide-specific cytotoxic T cells under serum-free conditions by mature human dendritic cells. *Arch Dermatol Res* 292:325.
3. **Jonuleit, H., A. Giesecke-Tüttenberg, T. Tütting, B. Thurner-Schuler, L. Paragnik, A. Kandemir, G. Schuler J. Knop and A.H. Enk** 2001. A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T cell responses in humans following intranodal injection. *Int J Cancer* 93:243.
4. **Jonuleit, H., E. Schmitt, G. Schuler, J. Knop, and A.H. Enk** 2000. Induction of Interleukin 10-producing, Nonproliferating CD4<sup>+</sup> T Cells with Regulatory Properties by Repetitive Stimulation with Allogeneic Immature Human Dendritic Cells. *J Exp Med* (192) 9:1213.
5. **Jonuleit, H., E. Schmitt, M. Stassen, A. Tüttenberg, J. Knop and A.H. Enk** 2001. Identification and functional characterization of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* (193) 11:1285.

## **Einleitung**

Dendritische Zellen (DC) stellen eine Familie von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC) dar, die aus hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks hervorgehen (1-3). DC sind durch ihre einzigartigen Fähigkeiten primäre Immunantworten zu induzieren charakterisiert (2). Aus hämatopoetischen Stammzellen entwickeln sich zirkulierende DC-Vorläufer die in periphere Gewebe einwandern und dort ein Netzwerk unreifer APC mit großer phagozytischer Kapazität bilden (2-4). Phänotypisch sind diese unreifen DC durch die konstitutive Expression von MHC ("Major Histocompatibility Complex") Klasse-I und Klasse-II Molekülen, bei gleichzeitig schwacher Expression costimulatorischer Moleküle gekennzeichnet (5, 6). Sie besitzen die Fähigkeit zur effizienten Internalisierung und Prozessierung von Antigenen. Unreife DC sind jedoch nur schwache Stimulatoren von ruhenden T-Zellen und ihre Fähigkeit zur Migration ist deutlich eingeschränkt. Erst inflammatorische Stimuli, wie sie z. B. in Folge von entzündlichen Gewebsverletzungen freigesetzt werden, induzieren eine Differenzierung zu reifen DC, die aktiv Antigene in die T-Zellareale lymphatischer Organe transportieren (3, 6). Während der Reifung werden der Phänotyp, die Morphologie und die funktionellen Eigenschaften der DC drastisch verändert. Zellvolumen und dendritische Morphologie nehmen deutlich zu, die Oberflächenexpression von MHC- und costimulatorischen Molekülen wird hochreguliert. Dagegen verlieren die Zellen ihre Fähigkeit zur Phagozytose und Prozessierung von Antigenen. Diese Veränderungen sind assoziiert mit der Entwicklung zu außerordentlich potenten, immunstimulatorischen Zellen (6). Allein diese reifen DC sind in der Lage primäre, T-Zell-vermittelte Immunantworten zu induzieren (2, 6).

## **Proinflammatorische Zytokine und Prostaglandine induzieren die terminale Reifung von DC *in vitro***

Einer der größten Fortschritte der letzten Jahre in der Charakterisierung von DC war die Entwicklung von Methoden zur Differenzierung dieser Zellen aus Vorläuferzellen *in vitro*. Es gelang die Etablierung von Kulturmethoden zur kontrollierten Herstellung verschiedener DC-Subpopulationen (7-12). Damit konnten die Reagenzien, die zur Ausreifung der DC-Vorläufer in immunstimulatorische, reife DC führen, identifiziert werden. Darüber hinaus gelang die

Erforschung von Signalen, die eine Modulation der funktionellen Eigenschaften von ausreifenden DC bewirken.

Die herausragende Bedeutung der DC für die Aktivierung und die Regulation von Immunantworten und die Entwicklung von Kulturmethoden zur kontrollierten Herstellung dieser Zellen *in vitro* führten schon früh zur Überlegung, DC als Adjuvants in der klinischen Immuntherapie von Tumoren einzusetzen (13). In experimentellen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass Tumorantigen-beladene DC sehr effizient antigenspezifische T-Zellantworten gegen verschiedene Tumore auslösen können, resultierend in einer verminderten Tumormasse und verlängerten Überlebenszeit der Tiere (14-18). Für den klinischen Einsatz am Menschen mussten allerdings vorab noch einige Fragen geklärt werden. In den meisten publizierten Protokollen wird fötales Kälberserum (FCS) zur Herstellung der DC verwendet. Darüber hinaus waren die funktionellen Eigenschaften von *in vitro* generierten DC nur unzureichend charakterisiert. Nur ein FCS-freies Kultursystem zur Herstellung humaner DC aus Plastik-adhärenenten Monozyten war beschrieben (11). Bei diesem 1996 von N. Romani et al. publizierten Kultursystem, werden Plastik-adhärenente Monozyten aus dem peripherem Blut für 7 Tage mit Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) und Interleukin-4 (IL-4) kultiviert. Das FCS wird in diesem Protokoll durch humanes, autologes Plasma ersetzt. Die so generierten, noch unreifen DC müssen anschließend in einem zweiten Schritt mit einem Monozyten-conditioniertem Medium (MCM) stimuliert werden, um die Differenzierung in reife DC zu induzieren. Das nicht näher charakterisierte MCM hat jedoch entscheidende Nachteile. Es muss für jeden Spender durch Stimulation von autologen Monozyten einzeln hergestellt werden und seine differenzierende Wirkung zeigt große Spender-abhängige Varianzen. Somit muss die optimale Konzentration zur Differenzierung der unreifen DC für jede Charge ausgetestet werden. Daher war die Entwicklung eines definierten Cocktails von Wachstumsfaktoren zur Differenzierung unreifer DC vor einem klinischen Einsatz der Zellen erforderlich.

*In vivo* wird die terminale Differenzierung von DC durch proinflammatorische Zytokine eingeleitet (19-21). Daher lag es nahe, den Effekt dieser Faktoren auf die Differenzierung von unreifen DC *in vitro* zu testen. Hierzu wurden Monozyten für 7 Tage in Anwesenheit von GM-CSF und IL-4 zu unreifen DC differenziert und anschließend für weitere 48 Stunden entweder mit MCM oder verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) stimuliert. Anschließend erfolgte die morphologische, phänotypische und

funktionelle Charakterisierung der DC-Populationen. Während unstimulierte, unreife DC einen weitgehend runden Zellkörper aufwiesen, zeigten 40-70% der Zellen nach Stimulation mit MCM oder einem Zytokincocktail bestehend aus  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL1}\beta$  und  $\text{IL-6}$  die charakteristische Morphologie reifer DC mit deutlich vergrößertem Zellkörper und ausgeprägten zytoplasmatischen Zellausläufern (Ref. 1, Fig. 1). Darüber hinaus induzierte sowohl MCM, als auch der Zytokincocktail die Hochregulierung von MHC Klasse-II und costimulatorischen Molekülen (Ref. 1, Fig. 2), ebenfalls Merkmale reifer DC. Ein weiteres Merkmal für reife humane DC ist die Expression von CD83 (22), einem Molekül, welches von unreifen DC nicht exprimiert wird. Nach 2-tägiger Stimulation mit MCM bzw. dem Zytokincocktail exprimierten 40-70% der DC diesen Marker. Offensichtlich konnte der Zytokincocktail ( $\text{TNF}\alpha$ /  $\text{IL1}\beta$ /  $\text{IL-6}$ ) das MCM in der Fähigkeit, die Ausreifung unreifer DC zu induzieren, vollständig ersetzen. Eine weitere Ergebnisverbesserung wurde durch die zusätzliche Stimulation mit Prostaglandin- $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ) erzielt, einem Mediator der auch *in vivo* bei entzündlichen Reaktionen vermehrt produziert wird (23).  $\text{PGE}_2$  in Kombination mit dem Zytokincocktail fördert zusätzlich den Reifungsprozess der DC, resultierend in einer Zellpopulation mit deutlich homogenerer dendritischer Morphologie und einer CD83-Expression auf mehr als 90% der so stimulierten Zellen (Ref. 1, Fig. 2). Dagegen zeigte  $\text{PGE}_2$  allein nur einen geringen stimulatorischen Effekt auf die Ausreifung der DC.

DC die aus Monozyten in Anwesenheit von GM-CSF und  $\text{IL-4}$  kultiviert werden, besitzen keinen stabilen Phänotyp. Werden diese unreifen DC in ein Zytokin-freies Medium transferiert verlieren sie ihren dendritischen Phänotyp und konvertieren zu adhärenen Makrophagen (15). Erst nach terminaler Differenzierung zu reifen DC ist der Phänotyp und die Funktion der DC irreversibel, d.h. die Zellen können nicht mehr zu Makrophagen konvertiert werden. Nach 48-stündiger Stimulation mit dem Zytokincocktail waren die ausgereiften DC irreversibel differenziert. Der dendritische Phänotyp blieb auch nach dem Entzug der Wachstumsfaktoren erhalten (Ref. 1, Tab. 1).

Terminal differenzierte DC sind äußerst potente Stimulatoren von primären T-Zellantworten. Diese funktionelle Eigenschaft der DC kann *in vitro* am einfachsten in einer gemischten Lymphozytenreaktion (MLR) untersucht werden. Hierbei werden die DC als Stimulatoren für ruhende, allogene T-Zellen eingesetzt und die induzierte Proliferation der alloreaktiven T-Zellen gemessen. Unreife, ausschließlich mit GM-CSF und  $\text{IL-4}$  generierte DC, zeigten in diesen Tests nur eine schwache T-Zell-stimulatorische Aktivität, sowohl für  $\text{CD4}^+$  T-Zellen,

als auch für CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Dagegen induzierten terminal differenzierte DC äußerst effizient die Proliferation der alloreaktiven T-Zellen. Eine halbmaximale Proliferation von CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde schon bei einem DC:T-Zellverhältnis von 1:300 erreicht, d.h. eine reife DC kann mindestens 300 T-Zellen aktivieren (Ref.1, Fig.3).

Eine weitere Besonderheit von aktivierten DC ist ihre Fähigkeit nach Stimulation Antigene aktiv aus der Peripherie in die lymphatischen Organe zu transportieren. Eine spontane migratorische Aktivität von DC kann *in vitro* mit Hilfe der Zeitraffer-Videomikroskopie bestimmt werden (24). Vergleichende Untersuchungen von unreifen mit reifen DC zeigten, dass unreife DC nur eine marginale migratorische Aktivität *in vitro* besitzen. Durch Stimulation mit MCM oder dem Zytokincocktail TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  und IL-6 stieg die spontane migratorische Aktivität der Zellen deutlich an. Die größte Aktivität zeigten DC, die in Anwesenheit von TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL-6 und PGE<sub>2</sub> differenziert wurden (Ref.1, Fig.4), dem Stimulus, der auch am effizientesten die Ausreifung der Zellen zu immunkompetenten, reifen DC bewirkte.

Der Zytokincocktail bestehend aus TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL-6 und PGE<sub>2</sub> erfüllt somit alle notwendigen Kriterien eines Reifungscocktails, um *in vitro* die reproduzierbare Differenzierung unreifer DC in immunstimulatorische, migratorische, reife DC zu induzieren. Diese Methode ermöglicht somit erstmals eine reproduzierbare Produktion großer Mengen humaner DC unter FCS-freien Bedingungen, ein erster Schritt zur kontrollierten Herstellung von DC-Impfstoffen, die für eine Immuntherapie von Tumorpatienten eingesetzt werden können.

### **Zur Induktion von Tumorpeptid-spezifischen zytotoxischen T-Zellen (CTL) *in vitro* sind terminal differenzierte dendritische Zellen notwendig**

Die Identifizierung von Tumor-assoziierten Antigenen in den letzten 10 Jahren eröffnet neue Möglichkeiten einer Tumor-spezifischen Immuntherapie (25). Durch die herausragende Bedeutung von DC für die Induktion und Regulation von Immunantworten sollten mit Tumor-assoziierten Antigenen beladene DC zur Immuntherapie besonders gut geeignet sein. Allerdings wurden in ersten klinischen Studien DC in sehr verschiedenen Reifungsstadien zur Vakzinierung verwendet, ohne dass zuvor die funktionellen Eigenschaften der einzelnen DC-

Populationen ausreichend charakterisiert wurden (26-29). Darüber hinaus waren diese ersten Studien allein auf die Beobachtung von Tumorremissionen als potentiellen therapeutischen Effekt fokussiert, ließen aber die Analyse der induzierten Immunantworten außer Betracht. Zur Beurteilung der Immunogenität von antigenbeladenen DC ist es dagegen erforderlich die induzierten Tumorantigen-spezifischen Immunantworten genau zu untersuchen. Insbesondere ist eine Quantifizierung und funktionelle Charakterisierung von antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen notwendig (29).

Vor dem klinischen Einsatz von Tumorantigen-beladenen DC als Impfstoff für Melanompatienten erfolgte zuvor die Analyse des Potenzials verschiedener DC-Populationen zur Induktion von zytotoxischen T-Zellen *in vitro*. Hierzu wurden unreife CD1a<sup>+</sup> und reife CD83<sup>+</sup> DC (Ref.2, Fig. 1) zur Induktion von Tumorantigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro* eingesetzt. Es erfolgte die wiederholte Stimulation von gereinigten CD8<sup>+</sup> T-Zellen gesunder Spender mit syngenen, antigenbeladenen reifen bzw. unreifen DC in parallelen Ansätzen. Die Herstellung der DC erfolgte aus dem peripherem Blut der Spender mit der bereits zuvor dargestellten Methodik (Ref.1). Unreife und reife DC wurden mit Peptiden der Tumor-assoziierten Antigene Melan-A/MART-1, Tyrosinase bzw. MAGE-1 in Abhängigkeit vom Haplotyp des Spenders beladen und zur Aktivierung der T-Zellen eingesetzt.

Während CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die wiederholt mit Tumorantigen-beladenen reifen DC stimuliert wurden, eine deutliche Expansion *in vitro* zeigten, war keine Expansion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach wiederholter Stimulation mit unreifen DC nachweisbar (Ref.2, Fig.2). Im Gegenteil, die wiederholte Stimulation mit unreifen DC führte zum kontinuierlichen Absterben der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Diese Resultate waren spenderunabhängig und für verschiedene Tumorantigene im gleichen Maß nachweisbar. Somit zeigte sich, dass auch für eine erfolgreiche antigenspezifische Aktivierung und Expansion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen – zumindest *in vitro* – eine Stimulation mit reifen DC notwendig ist.

Die ELISPOT-Technik (30) eignet sich zur quantitativen Bestimmung antigenspezifischer T-Zellen *in vitro*. Hierbei werden einzelne, aktivierte T-Zellen über ihre Zytokinfreisetzung nachgewiesen. Bereits nach einmaliger Stimulation CD8<sup>+</sup> T-Zellen gesunder Spender mit Tumorantigen-beladenen reifen CD83<sup>+</sup> DC war eine deutliche Vermehrung von antigenspezifischen T-Zellen mit dieser Technik nachweisbar. Aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen setzten antigenspezifisch Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) frei (Ref.2, Fig.3). Während vor Stimulation mit Tumorantigen-beladenen DC keine antigenspezifischen T-Zellen nachweisbar waren,

stieg schon nach der ersten Restimulation mit reifen DC der Anteil der Tumorantigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen durchschnittlich auf über 10% an. Dagegen ließ sich auch nach wiederholter Restimulation mit Tumorantigen-beladenen unreifen CD1a<sup>+</sup> DC bei den gleichen Spendern keine Expansion dieser IFN- $\gamma$ -freisetzenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachweisen (Ref.2, Fig.3). Zur Aktivierung und Expansion von Tumorantigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro* war eine Stimulation mit reifen DC notwendig. Unreife DC waren in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Proliferationsassays (Ref.1, Fig.3) hierzu nicht in der Lage.

Antigenspezifische Proliferation und Freisetzung von IFN- $\gamma$  sind letztlich nur Hinweise für eine Induktion von zytotoxischen T-Zellen. Die Fähigkeit der Zellen zur antigenspezifischen Lyse von Zielzellen kann *in vitro* mit Hilfe von Chromfreisetzungsassays bestimmt werden. Mit Hilfe dieser Assays konnte gezeigt werden, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen gesunder Spender, die mit Tumorantigen-beladenen reifen DC stimuliert wurden, zu potenten zytotoxischen T-Zellen differenzieren, die effizient antigenbeladene Zielzellen lysieren (Ref.2, Fig. 4). Diese Lyse war antigenspezifisch. In Abwesenheit des spezifischen antigenen Peptids bzw. nach Austausch durch ein irrelevantes Peptid wurden die Zielzellen von den CTL nicht lysiert. Dagegen waren Tumorantigen-beladene unreife DC *in vitro* nicht in der Lage, die Differenzierung von CD8<sup>+</sup> Vorläuferzellen in zytotoxische T-Zellen zu induzieren (Ref.2, Fig. 4). Auch die Ergebnisse der Chromfreisetzungsassays waren grundsätzlich spenderunabhängig und galten für verschiedene tumorassoziierte Antigene gleichermaßen. Allein die Stärke der zytotoxischen Antwort *in vitro* zeigte Spender- und antigenspezifische Varianzen. Reife CD83<sup>+</sup> DC, beladen mit Peptiden der Melanom-assoziierten Antigene Tyrosinase bzw. Melan-A/MART-1 induzierten sehr potente zytotoxische T-Zellantworten, die allerdings in ihrer Stärke von Spender zu Spender variierten. Dagegen war die zytotoxische Aktivität der induzierten MAGE-1-spezifischen CTL signifikant schwächer, als die Tyrosinase- bzw. Melan-A/MART-1-spezifischen T-Zellantworten der gleichen Spender (Ref.2, Fig. 5). Diese Antigen- bzw. spenderspezifischen Unterschiede waren unabhängig von der verwendeten Antigenkonzentration bzw. der Anzahl dendritischer Zellen, die zur Stimulation eingesetzt wurden. Dieses *in vitro* Model zur Induktion von zytotoxischen T-Zellen durch reife antigenbeladene DC könnte allgemein zur Bestimmung der Immunogenität von Tumor-assoziierten Antigenen genutzt werden. Darüber hinaus sollte mit diesem System auch die Identifizierung neuer Tumorantigene *in vitro* möglich sein.

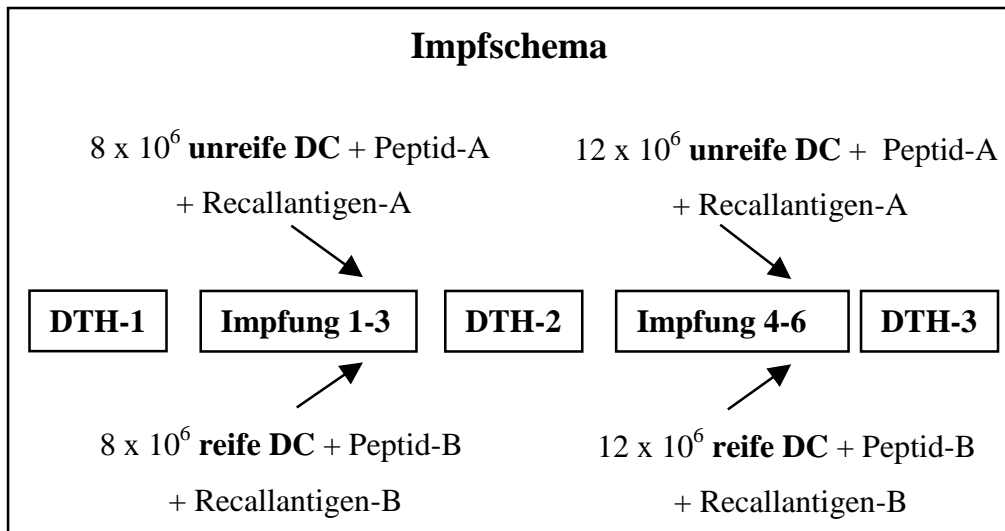


## **Zur effizienten Induktion von melanomspezifischen T-Zellantworten *in vivo* sind ebenfalls reife CD83<sup>+</sup> DC notwendig**

Verschiedene Reifungsstadien antigenbeladener DC wurden bereits zur experimentellen Immuntherapie von Tumorpatienten, insbesondere beim metastasierenden Melanom, in klinischen Studien eingesetzt (26, 27, 31). Die teilweise widersprüchlichen Resultate dieser Studien könnten auf Unterschiede in den Patientenkollektiven, aber auch auf Unterschieden in den immunstimulatorischen Fähigkeiten der verwendeten DC-Populationen zurückzuführen sein. Um die stimulatorische Kapazität von verschiedenen DC-Populationen *in vivo* vergleichen zu können, entwickelten wir eine neue Impfstrategie für Melanompatienten: Die simultane intranodale Injektion von antigenbeladenen unreifen und reifen DC in unterschiedliche Lymphknoten der Patienten. Zur Herstellung der DC-Populationen wurden zwei bereits etablierte Protokolle verwendet. Unreife DC, kultiviert in FCS-haltigem Medium und differenziert in Anwesenheit von GM-CSF und IL-4 (32) bzw. reife DC, generiert unter Fremdserum-freien Bedingungen und einer zusätzlichen Stimulation mit dem Zytokincocktail TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ /IL-6 und PGE<sub>2</sub>. Beide DC-Populationen sind durch unterschiedliche T-Zell-stimulatorische Fähigkeiten *in vitro* charakterisiert, reife und unreife DC wurden bereits zur Vakzinierung von Melanompatienten mit teilweise widersprüchlichen Ergebnissen in klinischen Studien eingesetzt (27, 31). Die gleichzeitige Injektion beider DC-Populationen in die gleichen Patienten ermöglichte erstmals einen direkten Vergleich der Effizienz dieser Impfstoffe. Unreife und reife DC wurden separat mit einem Peptid eines Melanom-assoziierten Antigens und einem "Recallantigen"<sup>1</sup> (Tetanustoxoid oder Tuberkulin) beladen, um die von beiden DC-Populationen induzierten T-Zellantworten getrennt untersuchen zu können (siehe Schema).

---

<sup>1</sup> Recallantigen: Antigene gegen die eine verbreitete Immunität besteht, erworben durch Impfung oder durch weitverbreitete Krankheitserreger.



Die verwendeten Antigenkombinationen wurden von Patient zu Patient ausgetauscht. Damit sollten ungleich hohe T-Zellvorläuferfrequenzen für einzelne Tumorantigene als alleinige Ursache für unterschiedliche T-Zellantworten ausgeschlossen werden. Die Injektion beider DC-Impfstoffe erfolgte intranodal, um die zuvor *in vitro* gemessenen Unterschiede in der migratorischen Kapazität von unreifen und reifen DC auszugleichen (siehe dazu Ref.1, Fig.4).

Die Vakzinierung der Melanompatienten mit DC zeigte nur milde Nebenwirkungen. Alle Patienten bekamen 1-2 Tage nach Injektion der Zellen vorübergehend Fieber, ein Teil der Patienten zeigte transiente Lymphknotenschwellungen. Die Injektion von Tumorantigen-beladenen reifen und unreifen DC ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer DC-Studien (27, 31) offensichtlich gut verträglich. Die klinischen Resultate waren allerdings sehr heterogen (Ref.3, Tab.3). Bei 2 von 8 Patienten konnte eine Stabilisierung des Krankheitsverlaufs erzielt werden. Diese Stabilisierung hält bereits seit mehr als 2 Jahren an, die Patienten werden weiterhin im Abstand von 3 Monaten vakziniert. 7 von 8 Patienten zeigten im Verlauf der Behandlung partielle oder komplette Remissionen einzelner Metastasen, bei einem Patienten konnte jedoch keine positive Beeinflussung des Krankheitsverlaufs durch die Impfung erzielt werden.

Die Analyse der "Recallantigen"-spezifischen T-Zellantworten zeigte, dass in 7 von 8 Patienten eine deutliche Immunantwort induziert werden konnte, wenn das "Recallantigen" von reifen DC präsentiert wurde. Dagegen war im peripheren Blut bei 5/8 Patienten auch nach mehrfacher Vakzinierung keine spezifische T-Zellantwort für das "Recallantigen", dass zur Beladung von unreifen DC verwendet wurde, nachweisbar (Ref.3, Fig.2).

Die Induktion von Tumorpeptid-spezifischen IFN- $\gamma$ -produzierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde mit der bereits zuvor geschilderten ELISPOT-Technik (Ref.2) analysiert. Hierzu wurden vor Beginn der Behandlung, nach dritter und sechster Vakzinierung die CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus peripherem Blut der Patienten isoliert und die Frequenzen antigenspezifischer T-Zellen im ELISPOT bestimmt. Im Blut aller Patienten ließ sich mit der ELISPOT-Technik eine Expansion von Tumorpeptid-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Vakzinierung mit peptidbeladenen reifen DC nachweisen (Ref.3, Fig.3). Es konnten sowohl MAGE-1-spezifische T-Zellen, als auch Tyrosinase- bzw. Melan-A/MART-1-spezifische T-Zellen induziert werden. Bei 5 von 7 Patienten waren mit Hilfe dieser sensitiven Technik bereits vor der Behandlung Tumorpeptid-spezifische T-Zellen nachweisbar. Diese konnten durch die Impfung signifikant vermehrt werden. 2 der 7 Patienten hatten vor der Vakzinierung keine nachweisbaren Tumorpeptid-spezifischen T-Zellen im Blut. Erst die Vakzinierung mit peptidbeladenen reifen DC induzierte die Bildung und Expansion dieser T-Zellen. Im Gegensatz dazu waren im Blut der gleichen Patienten in 6 von 7 Fällen keine oder nur marginale Expansionsraten peptidspezifischer T-Zellen nach Vakzinierung mit peptidbeladenen unreifen DC nachweisbar. Nur in einem von 7 Patienten konnte eine deutliche Expansion von Tyrosinase-peptidspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Impfung mit peptidgepulsten unreifen DC nachgewiesen werden.

Bei 4 von 8 Patienten konnten vor und nach Vakzinierung genügend CD8<sup>+</sup> T-Zellen gewonnen werden, um die Induktion von peptidspezifischen zytotoxischen T-Zellen *in vitro* zu analysieren. Im Blut von 2 dieser 4 Patienten konnte nach Vakzinierung mit peptidbeladenen reifen DC die Induktion von peptidspezifischen zytotoxischen T-Zellen nachgewiesen werden. Dagegen war in 3 dieser 4 Patienten keine Induktion zytotoxischer T-Zellen durch Impfung mit peptidbeladenen unreifen DC induzierbar (Ref.3, Fig.4). Interessanterweise zeigte ein Patient bereits vor Vakzinierung eine deutlich nachweisbare Zytotoxizität gegen das verwendete Melan-A/MART-1-Peptid. Diese zytotoxische Aktivität war nach Vakzinierung mit Melan-A/MART-1-peptidbeladenen unreifen DC deutlich reduziert.

Die DTH-Reaktionen (Überempfindlichkeitsreaktionen vom verzögerten Typ) der Patienten auf intradermale Injektion von unreifen bzw. reifen DC vor und nach Vakzinierung wurden ebenfalls analysiert. Tumorpeptid-spezifische DTH-Reaktionen konnten bei 3 von 5 Patienten nach der dritten DC-Impfung beobachtet werden, allerdings nur auf peptidbeladene reife DC.

Diese Reaktionen waren peptidspezifisch, unbeladene reife DC induzierten keine DTH-Reaktionen (Ref.3, Fig.5 und Tabelle 4). Dagegen traten bei 3 Patienten starke, lokale Entzündungsreaktionen bereits eine Stunde nach intradermaler Injektion von unreifen DC auf, gleichgültig ob die unreifen DC mit Peptid beladen waren oder nicht. Diese Reaktionen wurden offensichtlich durch die unreifen DC selbst ausgelöst. Die entzündlichen Reaktionen klangen innerhalb von 24-48 Stunden wieder ab. Charakteristische DTH-Reaktionen konnten nach Injektion von unreifen DC nicht beobachtet werden. Die Beobachtung einer entzündlichen Soforttypreaktion nach intranodaler Injektion dieser in FCS-haltigem Medium kultivierten unreifen DC ließ vermuten, dass in diesen Patienten eine FCS-spezifische Immunreaktion durch die Impfung induziert wurde. Eine FCS-spezifische T-Zellproliferation konnte nicht festgestellt werden. Allerdings führte die Untersuchung von Patientenserum in 2 Patienten zu einem Nachweis von Rinderprotein-spezifischen IgE Antikörperantworten, offensichtlich induziert durch die Impfung mit FCS-kultivierten unreifen DC.

Der direkte Vergleich des immunstimulatorischen Potenzials von antigenbeladenen unreifen und reifen DC *in vivo* zeigte, dass reife DC in Übereinstimmung mit den *in vitro* Ergebnissen zur Induktion von tumorspezifischen Immunantworten notwendig sind. Die Impfung der Melanompatienten mit terminal differenzierten DC induzierte die Expansion von Melanomantigen-spezifischen T-Zellantworten mit dem Erfolg partieller bzw. kompletter Remission einzelner Metastasen und der Stabilisierung des Krankheitsverlaufs bei 2 von 8 Patienten. Bei allen Patienten handelte es sich um austerapierte Patienten im späten Stadium IV. Möglicherweise kann mit dem Einsatz reifer antigenbeladener DC in früheren Krankheitsstadien mit einer geringeren Tumormasse der Patienten die Effizienz dieser Therapie noch erheblich gesteigert werden.

### **Eine wiederholte Stimulation von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit unreifen DC führt zur Induktion von IL-10-produzierenden regulatorischen T-Zellen**

Naive CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen differenzieren nach Aktivierung in Abhängigkeit vom Mikromilieu zu Effektorzellen, die sich durch ihre Zytokinmuster voneinander unterscheiden. Th1-Zellen (T-Helfer-1-Zellen) synthetisieren IL-2 und IFN- $\gamma$ , während Th2-Zellen IL-4, IL-5 und IL-6 bilden. Die Differenzierung der T-Helferzellen wird auch durch die Eigenschaften der APC mitbestimmt (33). Die funktionellen Eigenschaften dendritischer Zellen als APC für

T-Helferzellen sind strikt von dem Aktivierungsgrad und Reifungsstadium der Zellen abhängig (3). Eine Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit reifen DC induziert sehr effizient die Expansion dieser T-Zellen, während unreife DC nur eine mäßige Proliferation der T-Zellen induzieren (2). Um den Einfluss des Reifungsstadiums von DC auf den Differenzierungsprozess von T-Zellen zu untersuchen, wurden alloreaktive T-Zell-Linien durch wiederholte Stimulation von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit unreifen bzw. reifen allogenen DC *in vitro* generiert. Als Quelle für naive T-Zellen wurden gereinigte CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Nabelschnurblut verwendet. Für 7 Tage in Anwesenheit von GM-CSF und IL-4 differenzierte Monozyten dienten als CD83<sup>-</sup> unreife DC, nach zusätzlicher Stimulation mit dem Zytokincocktail TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und PGE<sub>2</sub> terminal differenzierte CD83<sup>+</sup> DC dienten als reife DC. Beide DC-Populationen generiert aus Monozyten der gleichen Spender wurden in parallelen Ansätzen zur Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen eingesetzt.

Die Stimulation von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit reifen allogenen DC induzierte eine starke Proliferation der alloreaktiven T-Zellen, die zu einer 30-50-fachen Expansion der Zellen nach 3 Stimulationen *in vitro* führte. Dagegen konnte nur eine schwache Expansion nach Aktivierung mit allogenen unreifen DC festgestellt werden. Darüber hinaus wurde die Proliferation der alloreaktiven T-Zellen in den folgenden Stimulationen mit unreifen DC immer schwächer und nach 2-3 Restimulationen waren nur noch marginale Zellteilungsraten nach Aktivierung mit unreifen DC nachweisbar (Ref.4, Fig.2). Deshalb war es nicht möglich stabile alloreaktive T-Zell-Linien mit allogenen unreifen DC zu induzieren. Allerdings konnten keine erhöhten Apoptose- oder Nekroseraten als Ursache für die fehlende Zellvermehrung in diesen Kulturen nachgewiesen werden.

Um die Proliferationskapazität alloreaktiver T-Zelllinien, induziert durch wiederholte Restimulation mit allogenen unreifen bzw. reifen DC weiter zu analysieren, wurden diese T-Zellen mit verschiedenen APC der gleichen Spender restimuliert. Es zeigte sich, dass alloreaktive T-Zell-Linien, die mit reifen DC induziert wurden, sowohl nach Restimulation mit PBMC (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes), als auch nach Aktivierung mit unreifen DC expandierten. Folglich konnten die unreifen DC nicht den Zelltod der T-Zellen induzieren oder die Aktivierung bereits differenzierter T-Zellen inhibieren. Im Gegensatz dazu ließ sich die supprimierte Zellteilungsfähigkeit von alloreaktiven T-Zellen, die wiederholt mit unreifen DC stimuliert wurden, weder mit PBMC, noch mit immunkompetenten reifen DC wieder aufheben (Ref.4, Fig.3). Selbst nach Zusatz von großen

Mengen exogenem IL-2 zeigten diese T-Zellen nur marginale Proliferationsraten. Somit inhibierte die wiederholte Stimulation von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit unreifen DC irreversibel die Fähigkeit der alloreaktiven T-Zellen zur antigenspezifischen Proliferation.

Die phänotypische Analyse der alloreaktiven T-Zellen zeigte, dass unreife und reife DC auch ein unterschiedliches Muster an Aktivierungsmarkern in den T-Zellen induzierten. Während beide T-Zellpopulationen nach Aktivierung eine vergleichbare Oberflächenexpression von CD3, CD4, CD25, CD28 und ICOS ("inducible costimulator") (34) aufwiesen, konnte nur nach Differenzierung mit reifen DC auf den T-Zellen eine Expression von CD69, CD70 und CD154 nachgewiesen werden. CD70 fördert die Synthese von IL-2 und IFN- $\gamma$  durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen und induziert gleichzeitig die Hochregulation von CD154 (35, 36). Darüber hinaus stellt die CD154-CD40-Interaktion ein kritisches Signal zur wechselseitigen Aktivierung von T-Zellen und DC dar (37-39). Im Gegensatz dazu zeigten nur T-Zellen nach Differenzierung mit unreifen DC eine Hochregulierung von CD152 auf der Zelloberfläche, dem hochaffinen Rezeptor von CD80 und CD86 (Ref.4, Fig.4). Die Kreuzvernetzung von CD152 inhibiert die Aktivierung, IL-2-Synthese und die Zellteilung voraktivierter T-Zellen (40-42). Somit korrelierten die ungleichen Phänotypen der resultierenden T-Zellen mit ihren unterschiedlichen Fähigkeiten zur antigenspezifischen Proliferation.

Funktionell verschiedene CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulationen unterscheiden sich vor allem durch ihre Zytokinmuster voneinander (33). Zur Bestimmung der Zytokinprofile der alloreaktiven T-Zellen nach wiederholter Stimulation mit reifen bzw. unreifen DC wurden die Zytokinmengen in den Kulturüberständen nach Aktivierung bestimmt. Darüber hinaus erfolgte der durchflußzytometrische Nachweis intrazellulärer Zytokine auf Einzelzellebene. Beide Testverfahren zeigten, dass reife DC effizient eine Differenzierung naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Th1-Zellen induzierten, die große Mengen an IFN- $\gamma$  und IL-2 produzierten. Dagegen verloren die T-Zellen nach wiederholter Stimulation mit unreifen DC ihre Fähigkeit zur Synthese von IFN- $\gamma$ , IL-2 oder des Th2-assoziierten Zytokins IL-4, differenzierten also weder in Th1- noch in Th2-Zellen (Ref.4, Fig.5). Gleichzeitig war nach wiederholter Restimulation eine erhöhte Synthese von IL-10 durch diese T-Zellen nachweisbar. Damit zeigten diese T-Zellen charakteristische Merkmale von regulatorischen T-Zellen, insbesondere die Bildung von IL-10 bei gleichzeitig inhibierter Proliferationsfähigkeit (43).

Ein Merkmal von regulatorischen T-Zellen ist ihre Fähigkeit nach Aktivierung die Proliferation von konventionellen CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu supprimieren (44). Um diese Fähigkeit

der alloreaktiven IL-10-produzierenden T-Zellen zu testen, wurden Kokulturen mit alloreaktiven Th1-Zellen durchgeführt. Die IL-10-produzierenden, selbst nicht proliferierenden T-Zellen inhibierten in diesen Kokulturen dosisabhängig die Proliferation von syngenen, alloreaktiven Th1-Zellen (Ref.4, Fig.6). Somit konnte gezeigt werden, dass der Reifungsgrad von DC einen direkten Einfluss auf die Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen hat. Eine wiederholte Aktivierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit unreifen DC als APC führt zur Differenzierung der T-Zellen in anergische, IL-10-produzierende, regulatorische T-Zellen, die effizient eine Aktivierung von Th1-Zellen verhindern. Dagegen führt die wiederholte Stimulation der naiven T-Zellen unter gleichen Kulturbedingungen mit reifen DC ausschließlich zur Differenzierung in Th1-Zellen.

Der inhibitorische Effekt der induzierten regulatorischen T-Zellen könnte durch den direkten Zellkontakt mit den T-Effektorzellen, durch Suppression der T-Zell-stimulatorischen Eigenschaften der APC oder alternativ durch lösliche, inhibitorische Faktoren verursacht werden. Diese Fragen sollten in einer zusätzlichen Serie von Experimenten geklärt werden. Als erstes erfolgte die Stimulation der T-Zellen in "Transwellexperimenten". In diesem Kultursystem wurden alloreaktive Th1-Zellen und regulatorische T-Zellen in Kokultur mit allogenen DC stimuliert. Bei einem Teil dieser Kulturen erfolgte die Stimulation in der gleichen Kulturschale, beide Ansätze waren aber durch eine "Transwellkammer", einer semipermeablen Polycarbonatmembran, voneinander getrennt. Die Membran erlaubte den freien Austausch löslicher Faktoren, nicht aber einen direkten Zellkontakt zwischen den stimulierten regulatorischen T-Zellen und Th1-Zellen. Mit Hilfe dieses Kultursystems konnte gezeigt werden, dass die Proliferation der Th1-Zellen nur dann inhibiert wurde, wenn ein direkter Kontakt der Zellpopulationen möglich war. In Anwesenheit der "Transwellkammer" war keine verminderte Proliferation der Th1-Zellen nachweisbar (Ref.4, Fig.7). Auch eine indirekte Inhibition der Th1-Zellen, durch Supprimierung der stimulatorischen Eigenschaften der DC, konnte ausgeschlossen werden. Eine Vorkultur von reifen DC mit regulatorischen T-Zellen führte nicht zur Veränderung der stimulatorischen Eigenschaften der DC (Ref.4, Fig. 8A). Somit konnte ein direkter Zellkontakt zwischen regulatorischen T-Zellen und Th1-Zellen vorausgesetzt werden, um die Aktivierung der Th1-Zellen zu verhindern. Lösliche Faktoren spielten für diesen Mechanismus offensichtlich keine Rolle. Durch blockierende Antikörper gegen IL-10, TGF- $\beta$  ("Transforming growth factor- $\beta$ ") oder CTLA-4 ("cytotoxic T lymphocyte-associated molecule 4") wurde der inhibitorische Effekt der regulatorischen T-Zellen nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu konnte durch große Mengen exogenem IL-2 die

Proliferation der Th1-Zellen teilweise wieder hergestellt werden (Ref.4, Fig. 8C), ein Hinweis darauf, dass der inhibitorische Effekt der regulatorischen T-Zellen zumindest teilweise auf einer Suppression der endogenen IL-2 Produktion von Th1-Zellen beruht.

Humane regulatorische T-Zellen, induziert durch wiederholte Stimulation von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit unreifen DC, verhindern die Aktivierung von T-Effektorzellen mit Hilfe eines zellkontaktabhängigen Mechanismus. Ist diese regulatorische Funktion der T-Zellen antigenspezifisch und setzt sie die Erkennung des Antigens auf der gleichen APC voraus? Zur Beantwortung dieser Fragen wurden alloreaktive Th1-Zellen und regulatorische T-Zellen der gleichen Spender, aber mit unterschiedlicher Antigenpezifität *in vitro* hergestellt. Hierzu erfolgte die wiederholte Stimulation syngener CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Nabelschnurblut mit allogenen reifen bzw. unreifen DC verschiedener Spender. Es zeigte sich, dass eine Erkennung des gleichen Antigens auf der gleichen APC für den suppressiven Effekt der regulatorischen T-Zellen nicht notwendig war. Spender-A-spezifische regulatorische T-Zellen inhibierten nicht nur die Aktivierung von Spender-A-spezifischen Th1-Zellen, sondern auch die Proliferation von Spender-B-spezifischen Th1-Zellen. Voraussetzung war allerdings, dass beide T-Zellpopulationen mit den entsprechenden allogenen DC stimuliert wurden. Die Kokultur der Th1-Zellen mit unstimulierten regulatorischen T-Zellen verhinderte nicht die Aktivierung der Th1-Zellen (Ref.4, Fig.8B). Somit war die inhibitorische Funktion der regulatorischen T-Zellen Zellkontakt- und aktivierungsabhängig, aber vollständig antigenunspezifisch.

Die Induktion von regulatorischen T-Zellen durch unreife DC könnte einen wichtigen Mechanismus zur Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz darstellen. In diesem Model wird in Abwesenheit von entzündlichen Infektionen keine Ausreifung von unreifen DC induziert. Die Präsentation von Autoantigenen durch unreife DC führt folglich über die Differenzierung und/oder Aktivierung von regulatorischen T-Zellen zur Inaktivierung von potentiell autoreaktiven T-Zellen und damit zur Verhinderung von autoaggressiven Phänomenen.



## **Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von humanen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen, isoliert aus dem peripheren Blut**

Die adaptive Immunantwort repräsentiert ein äußerst effektives und dynamisches System, welches den Organismus vor chronischen Infektionen mit Pathogenen schützt. Dieser Abwehrmechanismus beinhaltet die Bildung von Pathogen-spezifischen T-Effektorzellen, aber auch das hohe Risiko zur Entwicklung von autoreaktiven T-Zellen. Die klonale Deletion als ein Mechanismus der zentralen Toleranz schützt uns nur bedingt vor der Entstehung einer Autoimmunität. Zusätzliche, periphere Mechanismen wie z.B. die Anergieinduktion von autoaggressiven T-Zellen sind zur Kontrolle des Immunsystems notwendig. Gleichzeitig konnte aus verschiedenen Tiermodellen die Erkenntnis gewonnen werden, dass eine spezialisierte T-Zellpopulation aktiv zur Kontrolle von autoreaktiven T-Effektorzellen in der Peripherie beiträgt (45-48). Diese sogenannten regulatorischen T-Zellen in der Maus sind phänotypisch charakterisiert als CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD45RB<sup>low</sup> T-Zellen. Unsere Ergebnisse zur Induktion humaner regulatorischer T-Zellen, durch wiederholte Stimulation von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit unreifen DC ließen vermuten, dass eine vergleichbare T-Zellpopulation auch im Blut des Menschen zur Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz vorhanden sein könnte. Deshalb untersuchten wir die funktionellen Eigenschaften von T-Zellsubpopulationen, die aus dem peripheren Blut isoliert wurden.

Zur Analyse von humanen T-Zellsubpopulationen wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Lymphozytenkonzentraten ("Buffy coats") zufällig ausgewählter gesunder Blutspender isoliert und die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen von den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen getrennt. Beide Subpopulationen exprimierten den  $\alpha/\beta$  T-Zellrezeptor, CD3 und CD4 in vergleichbarer Dichte. Allerdings fanden sich in der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellpopulation deutlich mehr Zellen, die MHC Klasse-II- und CD45RO-positiv waren, einem charakteristischen Phänotyp differenzierter bzw. voraktivierter T-Helferzellen (Ref.5, Fig.1A). Nach Aktivierung mit allogenen DC wurden diese Oberflächenmarker auf beiden Populationen hochreguliert (Ref. 5, Fig. 1B). Eine Subpopulation der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen exprimierte konstitutiv intrazellulär CTLA-4 (Ref.5, Fig.2A). Schon wenige Stunden nach Stimulation mit allogenen DC, anti-CD3 Antikörpern bzw. PHA (Phytohämagglutinin), war dieser Marker auf der Zelloberfläche der T-Zellen nachweisbar und die Expression blieb anschließend für Wochen erhalten (Ref.5, Fig. 2B).

Während  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen hohe Expansionsraten nach Stimulation mit allogenen DC zeigten, war nur eine marginale Proliferation von aktivierten  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen messbar (Ref.5, Fig.2C), verbunden mit einem Zellzyklusarrest der T-Zellen in der G1/G0-Phase (Ref.5, Fig.2D). Frisch isolierte  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen waren damit genauso anergisch wie zuvor durch unreife DC *in vitro* induzierte regulatorische T-Zellen. Auch die Zytokinprofile von  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen und  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen wiesen deutliche Unterschiede auf.  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen differenzierten nach wiederholter Stimulation mit reifen allogenen DC ausschließlich zu Th1-Zellen und produzierten große Mengen an IL-2 und IFN- $\gamma$ . Dagegen konnte auch nach mehrfacher Stimulation der  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen keine Bildung von IL-2, IL-4, IL-5, oder IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden (Ref.5, Fig. 3A, 3B). Lediglich auf mRNA-Ebene war die Bildung von IL-10 und TGF- $\beta$  zu beobachten (Ref.5, Fig. 3C). Im Gegensatz zu *in vitro* induzierten regulatorischen T-Zellen produzierten humane  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen aus dem peripheren Blut auf Proteinebene kein nachweisbares IL-10.

Die Unfähigkeit der  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen zur antigenspezifischen Proliferation nach Aktivierung mit allogenen reifen DC ließ sich auch durch zusätzliche Stimulation der T-Zellen mit anti-CD3-, anti-CD28-Antikörpern oder durch blockierende Antikörper gegen TGF- $\beta$ , IL-10 oder CTLA-4 nicht wiederherstellen. Allerdings ließ sich die Anergie der T-Zellen durch Zugabe von hohen Mengen an IL-2 oder IL-4 partiell und durch gleichzeitige Zugabe von IL-2 und IL-4 vollständig aufheben (Ref.5, Fig.4). Im Gegensatz zu *in vitro* induzierten regulatorischen T-Zellen war somit die Anergie von  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen aus dem peripheren Blut nicht irreversibel.

Die Analyse der regulatorischen Fähigkeiten von  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen zeigte, dass diese T-Zellpopulation in Kokultur die Proliferation und Zytokinsynthese von konventionellen  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen dosisabhängig inhibierte (Ref.5, Fig.5A, 5B). Diese inhibitorische Funktion der  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen war vergleichbar der suppressiven Wirkung von *in vitro* induzierten, IL-10-produzierenden regulatorischen T-Zellen. Der inhibitorische Effekt von frisch isolierten  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen konnte nach Stimulation mit allogenen DC, aber auch nach polyklonaler Aktivierung mit anti-CD3 Antikörpern und bestrahlten PBMC festgestellt werden (Ref.5, Fig.5C). In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die inhibitorische Wirkung von  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen auf die Proliferation und Zytokinbildung von aktivierten  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen einen direkten Zellkontakt beider T-Zellpopulationen voraussetzte. Gleichzeitig aber war dieser inhibitorische Effekt unabhängig von der

Interaktion mit CTLA-4, einem inhibitorischen Rezeptor, der von den regulatorischen T-Zellen konstitutiv exprimiert wurde. Wahrscheinlich ist die CTLA-4-Expression für die Homeostasis der Zellen, nicht aber für deren suppressive Funktion notwendig. Darüber hinaus ließ sich die Proliferation der Th1-Zellen auch nicht durch Antikörper gegen IL-10 oder TGF- $\beta$  wiederherstellen (Ref.5, Fig.6A). Dieser suppressive Effekt der T-Zellen war antigenunspezifisch, setzte aber eine T-Zellrezeptorstimulation der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen voraus (Ref.6, Fig.6B).

Im Gegensatz zu murinen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen (49) beinhalten frisch isolierte humane CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen zwei unterschiedliche Subpopulationen. Die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Zellpopulation stellt eine zu den murinen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen vergleichbare regulatorische T-Zellpopulation dar, während die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> T-Zellen eine normale Proliferationsfähigkeit *in vitro* zeigten und weder die Proliferation, noch die Zytokinbildung von konventionellen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen inhibierten (Ref.5, Fig.7). Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um differenzierte bzw. voraktivierte, konventionelle T-Zellen.

Ein Grossteil der humanen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen, die 5-10% der T-Zellen im peripheren Blut bilden, stellen eine spezialisierte Population regulatorischer T-Zellen dar, die analog zu murinen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen die Proliferation und Zytokinbildung von konventionellen T-Helferzellen supprimieren. Im Gegensatz zu *in vitro* aus Nabelschnurzellen induzierten regulatorischen T-Zellen produzieren die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen kein IL-10 und ihr anergischer Zustand lässt sich durch eine Kombination aus IL-2 und IL-4 aufheben. Die großen funktionellen und phänotypischen Ähnlichkeiten beider T-Zellpopulationen weisen jedoch darauf hin, dass es sich um unterschiedliche Aktivierungsstadien einer regulatorischen Zellpopulation handeln könnte. Die Bildung dieser T-Zellen könnte im Thymus durch unreife DC induziert werden. Ihre regulatorische Funktion könnte in der Peripherie durch reife immunkompetente DC aufrechterhalten werden. Diese funktionell spezialisierten regulatorischen T-Zellen bilden eine wichtige Komponente des Immunsystems zur Kontrolle von autoaggressiven T-Zellen und zur Verhinderung von pathogenen Autoimmunerkrankungen (44).

Die Entdeckung von Vorläufern dendritischer Zellen im peripheren Blut und die Charakterisierung der Signale, die eine Ausreifung dieser Zellen in immunkompetente, reife DC induzieren, hat zu neuen Erkenntnissen der Regulation von Immunantworten geführt (2). Während terminal differenzierte DC sehr effizient die Aktivierung des Immunsystems und die Bildung von T-Effektorzellen einleiten, können tolerogene unreife DC spezifisch Immunantworten abschalten (50, 51). Die Ausreifung von DC in der Peripherie ist funktionell sinnvoll an inflammatorische Zytokine gebunden, die *in vivo* in Folge von entzündlichen Infektionen freigesetzt werden (4). Nach terminaler Differenzierung wandern die ausgereiften DC in die sekundären lymphoiden Organe ein und leiten dort die primären Immunantworten ein. Unreife, tolerogene DC konnten *in vivo* in Assoziation mit Tumoren gefunden werden (52-54). Diese DC waren *ex vivo* in der Lage spezifisch T-Zellantworten gegen Tumorantigene abzuschalten. Da viele Tumoren zusätzlich große Mengen an IL-10 bilden, könnte die tolerogene Wirkung von unreifen und IL-10-modulierten DC einen "Immunescapemechanismus" von Tumoren darstellen (52, 53). Die vergleichende Untersuchung von antigenbeladenen unreifen und reifen DC als natürlicher Impfstoff für Melanompatienten zeigte, dass nur reife, IL-10-resistente DC (exprimieren keinen IL-10-Rezeptor) zur Vakzinierung von Tumorpatienten eingesetzt werden sollten, um die Induktion einer tumorspezifischen T-Zelltoleranz zu verhindern. Die zusätzliche Beobachtung, dass eine wiederholte Stimulation von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro* zur Bildung von regulatorischen T-Zellen führte und funktionell vergleichbare regulatorische T-Zellen auch *ex vivo* nachgewiesen werden konnten, führte zu folgendem Model der T-Zelldifferenzierung in Abhängigkeit vom Reifungsstadium der DC: Die Aktivierung von ruhenden T-Zellen durch reife DC führt zur Bildung von entzündlichen T-Effektorzellen. Unreife, IL-10-modulierte DC induzieren eine antigenspezifische T-Zellanergie (50, 51). Darüber hinaus führt eine Aktivierung ruhender T-Zellen mit unreifen DC, ohne zusätzlich Modulation der DC, zur Induktion von regulatorischen T-Zellen, die eine Aktivierung von T-Effektorzellen als Mechanismus der Gegenregulation unterdrücken.

## Literaturverzeichnis

1. Young, J.W. and R.M. Steinman. 1990. Dendritic cells stimulate primary human cytolytic lymphocyte responses in the absence of CD4+ helper T cells. *J. Exp. Med.* 171:1315-1332.
2. Banchereau, J. and R.M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
3. Cella, M., F.Sallusto, and A.Lanzavecchia. 1997. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 9:10-16.
4. Jonuleit, H., J. Knop, and A.H. Enk. 1996. Cytokines and their effects on maturation, differentiation and migration of dendritic cells. *Arch. Dermatol. Res.* 289:1-8.
5. Romani, N. and G. Schuler. 1992. The immunologic properties of epidermal Langerhans cells as a part of the dendritic cell system. *Springer Semin. Immunopathol.* 13:265-279.
6. Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y.J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18:767-811.
7. Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R.M. Steinman. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 176:1693-1702.
8. Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, I. Durand, M. Cella, A. Lanzavecchia, and J. Banchereau. 1997. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood* 90:1458-1470.
9. Bender, A., M. Sapp, G. Schuler, R.M. Steinman, and N. Bhardwaj. 1996. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J. Immunol. Methods* 196:121-135.
10. Thurner, B., C. Roder, D. Dieckmann, M. Heuer, M. Kruse, A. Glaser, P. Keikavoussi, E. Kämpgen, A. Bender, and G. Schuler. 1999. Generation of large numbers of fully mature and

stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J. Immunol. Methods* 223:1-15.

11. Romani, N., D. Reider, M. Heuer, S. Ebner, E. Kämpgen, B. Eibl, D. Niederwieser, and G. Schuler. 1996. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J. Immunol. Methods* 196:137-151.

12. Rieser, C., G. Bock, H. Klocker, G. Bartsch, and M. Thurnher. 1997. Prostaglandin E2 and tumor necrosis factor alpha cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of interleukin 12 production. *J. Exp. Med.* 186:1603-1608.

13. Schuler, G. and R.M. Steinman. 1997. Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors. *J. Exp. Med.* 186:1183-1187.

14. Porgador, A., D. Snyder, and E. Gilboa. 1996. Induction of antitumor immunity using bone marrow-generated dendritic cells. *J. Immunol.* 156:2918-2926.

15. Zitvogel, L., J.I. Mayordomo, T. Tjandrawan, A.B. DeLeo, M.R. Clarke, M.T. Lotze, and W.J. Storkus. 1996. Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *J. Exp. Med.* 183:87-97.

16. Tüting, T., A.B. DeLeo, M.T. Lotze, and W.J. Storkus. 1997. Genetically modified bone marrow-derived dendritic cells expressing tumor-associated viral or "self" antigens induce antitumor immunity in vivo. *Eur. J. Immunol.* 27:2702-2707.

17. Celluzzi, C.M., J.I. Mayordomo, W.J. Storkus, M.T. Lotze, and L.D.J. Falo. 1996. Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *J. Exp. Med.* 183:283-287.

18. Celluzzi, C.M. and L.D.J. Falo. 1997. Epidermal dendritic cells induce potent antigen-specific CTL-mediated immunity. *J. Invest. Dermatol.* 108:716-720.

19. Cella, M., A. Engering, V. Pinet, J. Pieters, and A. Lanzavecchia. 1997. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388:782-787.

20. Roake, J.A., A.S. Rao, P.J. Morris, C.P. Larsen, D.F. Hankins, and J.M. Austyn. 1995. Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and interleukin 1. *J. Exp. Med.* 181:2237-2247.
21. Roake, J.A., A.S. Rao, P.J. Morris, C.P. Larsen, D.F. Hankins, and J.M. Austyn. 1995. Systemic lipopolysaccharide recruits dendritic cell progenitors to nonlymphoid tissues. *Transplantation* 59:1319-1324.
22. Zhou, L.J. and T.F. Tedder. 1995. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J. Immunol.* 154:3821-3835.
23. Salmon, J.A. and G.A. Higgs. 1987. Prostaglandins and leukotrienes as inflammatory mediators. *Br. Med. Bull.* 43:285-296.
24. Friedl, P., P.B. Noble, and K.S. Zanker. 1993. Lymphocyte locomotion in three-dimensional collagen gels. Comparison of three quantitative methods for analysing cell trajectories. *J. Immunol. Methods* 165:157-165.
25. Boon, T., J.C. Cerottini, B. Van den Eynde, P. van der Bruggen, and A. Van Pel. 1994. TI - Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 12:337-365.
26. Hsu, F.J., C. Benike, F. Fagnoni, T.M. Liles, D. Czerwinski, B. Taidi, E.G. Engleman, and R. Levy. 1996. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* 2:52-58.
27. Nestle, F.O., S. Alijagic, M. Gilliet, Y. Sun, S. Grabbe, R. Dummer, G. Burg, and D. Schadendorf. 1998. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* 4:328-332.
28. Wen, Y.J., M. Ling, R. Bailey-Wood, and S.H. Lim. 1998. Idiotypic protein-pulsed adherent peripheral blood mononuclear cell- derived dendritic cells prime immune system in multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.* 4:957-962.
29. Schuler, G., B. Thurner, and N. Romani. 1997. Dendritic cells: from ignored cells to major players in T-cell-mediated immunity. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 112:317-322.
30. Herr, W., J. Schneider, A.W. Lohse, z.B.K. Meyer, and T. Wölfel. 1996. Detection and quantification of blood-derived CD8<sup>+</sup> T lymphocytes secreting tumor necrosis factor alpha in

response to HLA-A2.1-binding melanoma and viral peptide antigens. *J. Immunol. Methods* 191:131-142.

31. Thurner, B., I. Haendle, C. Roder, D. Dieckmann, P. Keikavoussi, H. Jonuleit, A. Bender, C. Maczek, D. Schreiner, P. von den Driesch, E.B. Brocker, R.M. Steinman, A. Enk, E. Kämpgen, and G. Schuler. 1999. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J. Exp. Med.* 190:1669-1678.

32. Romani, N., S. Gruner, D. Brang, E. Kämpgen, A. Lenz, B. Trockenbacher, G. Konwalinka, P.O. Fritsch, R.M. Steinman, and G. Schuler. 1994. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* 180:83-93.

33. Mosmann, T.R. and S. Sad. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today* 17:138-146.

34. Hutloff, A., A.M. Dittrich, K.C. Beier, B. Eljaschewitsch, R. Kraft, I. Anagnostopoulos, and R.A. Kroczeck. 1999. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397:263-266.

35. Hintzen, R.Q., S.M. Lens, K. Lammers, H. Kuiper, M.P. Beckmann, and R.A. van Lier. 1995. Engagement of CD27 with its ligand CD70 provides a second signal for T cell activation. *J. Immunol.* 154:2612-2623.

36. Stuhler, G., A. Zobywalski, F. Grunebach, P. Brossart, V.L. Reichardt, H. Barth, S. Stevanovic, W. Brugger, L. Kanz, and S.F. Schlossman. 1999. Immune regulatory loops determine productive interactions within human T lymphocyte-dendritic cell clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96:1532-1535.

37. Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, C. Van Kooten, I. Durand, and J. Banchereau. 1994. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J. Exp. Med.* 180:1263-1272.

38. Cella, M., D. Scheidegger, K. Palmer Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia, and G. Alber. 1996. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.* 184:747-752.



39. Koch, F., U. Stanzl, P. Jennewein, K. Janke, C. Heufler, E. Kämpgen, N. Romani, and G. Schuler. 1996. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J. Exp. Med.* 184:741-746.
40. Waterhouse, P., J.M. Penninger, E. Timms, A. Wakeham, A. Shahinian, K.P. Lee, C.B. Thompson, H. Griesser, and T.W. Mak. 1995. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4. *Science* 270:985-988.
41. Thompson, C.B. and J.P. Allison. 1997. The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. *Immunity* 7:445-450.
42. Chambers, C.A., M.F. Krummel, B. Boitel, A. Hurwitz, T.J. Sullivan, S. Fournier, D. Cassell, M. Brunner, and J.P. Allison. 1996. The role of CTLA-4 in the regulation and initiation of T-cell responses. *Immunol. Rev.* 153:27-46.
43. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E.de Vries, and M.G. Roncarolo. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737-742.
44. Sakaguchi, S. 2000. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 101:455-458.
45. Sakaguchi, S. 2000. Animal models of autoimmunity and their relevance to human diseases. *Curr. Opin. Immunol.* 12:684-690.
46. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155:1151-1164.
47. Suri-Payer, E., A.Z. Amar, A.M. Thornton, and E.M. Shevach. 1998. CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J. Immunol.* 160:1212-1218.

48. Powrie, F., J. Carlino, M.W. Leach, S. Mauze, and R.L. Coffman. 1996. A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 183:2669-2674.
49. Thornton, A.M. and E.M. Shevach. 2000. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J. Immunol.* 164:183-190.
50. Steinbrink, K., M. Wolf, H. Jonuleit, J. Knop, and A.H. Enk. 1997. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J. Immunol.* 4772-4780.
51. Steinbrink, K., H. Jonuleit, G. Muller, G. Schuler, J. Knop, and A.H. Enk. 1999. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* 93:1634-1642.
52. Enk, A.H., H. Jonuleit, J. Saloga, and J. Knop. 1997. Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int. J. Cancer* 73:309-316.
53. Kiertcher, S.M., J. Luo, S.M. Dubinett, and M.D. Roth. 2000. Tumors promote altered maturation and early apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 164:1269-1276.
54. Wojtowicz-Praga, S. 1997. Reversal of tumor-induced immunosuppression: a new approach to cancer therapy. *J. Immunother.* 20:165-177.