

Erforschung Dendritischer Zellen des Menschen

Der Göttinger Alleingang

J. Hinrich Peters hat über Jahrzehnte eine eigenständige Forschung betrieben mit dem Ziel, den Mechanismus der Immunaktivierung zu ergründen.

Erste Pionierleistungen führten zur Entdeckung der Aktivierung von Carriern in der Lymphozytenmembran, der Bildung von *gap junctions* und der zellkontakt-abhängigen Zellkooperation in der Lymphozyten-Stimulation, seinerzeit noch fokussiert auf Makrophagen als Kooperationspartner. Später konzentrierten sich die Untersuchungen auf die dendritische Zelle und – als besonderes Wagnis – auf die des Menschen mit der 1987 publizierten These, daß DC aus Monozyten abgeleitet werden können.

1992 setzte die Arbeitsgruppe Peters den Schlußstein in der Aufklärung der Signale, die für die Differenzierung der dendritischen Zellen verantwortlich sind, heute als das „klassische Protokoll“ (Pickl 1996; Li 2000; Ruwhof 2002; Breckpot 2005) bezeichnet. Gleichzeitig konsolidierten Peters und seine Mitarbeiter die bis dahin nicht für möglich gehaltene myeloide Herkunft der Zelle, die seither die „myeloide dendritische Zelle“ genannt wurde.

Nebenbei wurde hier zum erstenmal gezeigt, daß eine Zelle sich in 2 alternative Richtungen differenzieren kann, somit den Charakter einer somatischen Stammzelle hat.

Diese Erkenntnisse erblickten meist zur Unzeit das Licht der Welt, waren oft gegen den *mainstream* gerichtet, blieben wenig beachtet und setzten sich nur *per diffusionem* durch.

Hiermit öffnete sich aber der Weg, dendritische Zellen aus Monozyten (weißen Blutkörperchen), ihren myeloiden Vorstufen im Blut, in der Zellkultur zu differenzieren. Damit eröffnete sich auch der Weg für eine therapeutische Anwendung beim Menschen, die dann Ende der 90er Jahre begann. Seither erscheinen bis zu 1000 Publikationen pro Jahr über die „monozytäre Dendritische Zelle“ („monocyte-derived dendritic cell, MoDC“. Heute wird die Zelle auch gelegentlich als „Peters-Zelle“ bezeichnet.

Weitere Verdienste Peters' bei der Bekämpfung von Mykoplasmen (Nature 285 (1980) 661-662), der Entwicklung der Zellfusion und der Herstellung von monoklonalen Antikörpern sowie die hieraus entstandene Monographie, die drei Auflagen erreichte, sind hier nicht dargestellt.

J. Hinrich Peters, Arzt, und seit 1982 Professor der Immunologie an der Universität Göttingen, entschied sich Ende der 70er Jahre, den Mechanismus der Immunstimulation aus dem Blickwinkel der dendritischen Zelle zu verfolgen.

Dies hatte aber bereits einen langen Vorlauf in der eigenen Fragestellung, wie der Mechanismus der Immunstimulation zu verstehen sei. Unten ist in der Literaturliste dargestellt, wie dies am Max-Planck-Institut für Biologie zur Entdeckung von schnell aktivierten Transportern der Lymphozytenmembran führte. Dies sah er im Zusammenhang mit der Zellkooperation, gelang doch Hülser und Peters die Entdeckung von *gap junctions*, die ebenfalls mit der Stimulation aktiviert wurden. Am Karolinska Institut in Stockholm betrieb er die Zellfusion, die es ihm ermöglichte, am Max-Planck-Institut für Virusforschung die virus-induzierte Zellfusion durch Polyethylenglykol zu ersetzen. Danach beschrieb Peters (am Institut für Genetik in Köln) die zellkontaktabhängige Stimulation der Lymphozyten und entwickelte daraus eine 2-Signal-Theorie der Lymphozytenstimulation. Damit war ein zellbiologisches Korrelat zur Kooperation zwischen „akzessorischen“ Zellen und Lymphozyten geschaffen, das zwangsläufig in die Fokussierung der Forschung auf die dendritischen Zellen einmündete.

Anfang der 80er Jahre, nun an der Universität Göttingen, tat Peters den damals ungewöhnlichen Schritt, die dendritischen Zellen am Menschen untersuchen zu wollen, ungewöhnlich deswegen, da die Immunologie überwiegend an der Maus erforscht wurde, da das menschliche Immunsystem nur schwer zugänglich ist. Aber als Mediziner wollte er den Bezug zur Therapie am Menschen herstellen. Über Jahre arbeitete er darin praktisch konkurrenzlos, da diese Zellen von den meisten anderen Immunologen noch als unbedeutend eingestuft wurden: „*innocent bystander cells*“.

1987 konnte Peters die These aufstellen, daß Dendritische Zellen sich aus Monozyten züchten lassen. Ihre Zuordnung zur myeloiden Reihe verstieß gegen mehrere Paradigmen, aber setzte sich langsam durch - schon aus praktischen Gründen - denn: Monozyten gehören zu den weißen Blutkörperchen und können leicht gewonnen werden.

Die damaligen Widerstände von Seiten der DC-Forscher wie der Makrophagen-Fachleute waren beträchtlich. Mit der monozytären Herkunft mußten die dendritischen Zellen mit den Makrophagen verwandt sein – damit wurde eine Auffassung Steinman's verletzt: Nach seinem Paradigma sollten DC nicht mit Monozyten-Makrophagen verwandt sein.

Um die Göttinger These an einem zweiten Modell zu erhärten, wurden an der Ratte Knochenmarkstudien durchgeführt, die die Herkunft aus der myeloiden Zellreihe und damit die Verwandtschaft mit Makrophagen untermauerten.

1992 konnte Peters' Göttinger Arbeitsgruppe dann die heute gültige Signalgebung zur Entwicklung von Dendritischen Zellen aus Monozyten bekanntgeben. Die Übertragung auf den Menschen war gebahnt. Es dauerte weitere 2 Jahre, bis die konkurrierenden Gruppen dies akzeptierten (und als eigene Befunde publizierten), und bis Ende der 90er Jahre, bis die durch diese Entdeckung ermöglichte Anwendung der Dendritischen Zellen zu ersten Ergebnissen bei experimentellen Tumorstudien führte. Heute erscheinen Jahr für Jahr bis zu tausend wissenschaftliche Arbeiten, die die „*monocyte-derived dendritic cell*“ zum Forschungsinhalt haben.

Während andere die dendritischen Zellen weiter durch Reinigung zu gewinnen suchten, hatte die Peters'sche Gruppe also den Weg der Ontogenese, der Züchtung aus den Vorstufen, begründet.

Ein gängiger Vorwurf besagte seinerzeit, daß Vorläufer der dendritischen Zellen sich als stabile Subpopulationen unter den Monozyten verbergen könnten und eine Herkunft aus Monozyten nur vortäuschten. Peters setzte dieser nie belegten Alternative die These der Plastizität von Monozyten entgegen.

Das Konzept der Plastizität von Monozyten hat zu bedeutenden Implikationen geführt: Zum ersten Mal war mit der Göttinger Entdeckung gezeigt worden, daß aus Monozyten nicht nur Makrophagen entstehen können. Heute ist die Entstehung von Osteoklasten und Mikroglia aus Monozyten oder ihren Vorläufern gesichert, die von Endothelien und follikulären dendritischen Zellen wahrscheinlich; und therapeutische Bedeutung erlangen gegenwärtig immunsuppressive und regenerative Zellen, die aus Monozyten gezüchtet werden. Damit hat sich die These der Plastizität von Monozyten letztlich durchgesetzt: Der Monozyt kann als somatische Stammzelle verstanden werden.

Es war nun klar, daß die dendritische Zelle (DC) die Starterzelle der Immunreaktion ist, von zentraler Rolle in der Steuerung und der Signalgebung. Beladung der DC mit Antigenen folgte also dem natürlichen Prozeß der Immunstimulation und nutzte den enormen Amplifikationsprozeß der Immunkaskade. Damit wurde es möglich, bis dahin schwierige oder stark behinderte Immunisierungsversuche neu aufzurollen, so die gegen Tumoren.

Ende der 90er Jahre gründete der Arzt Dr. Thomas Neßelhut gemeinsam mit Prof. Peters als Ausgründung der Universität Göttingen die DC-Gesellschaft am Institut für Tumorthherapie, um die aktuellen Erkenntnisse mit den schon bekannten Impftechniken gegen Tumoren zu kombinieren.

Seither wurden Individualtherapien und Studien in zunehmendem Maße an Tumorpatienten vorgenommen. Ein eigenes Forschungslabor begleitet die Therapien wissenschaftlich, erforscht und entwickelt Qualitätskriterien und publiziert die Erkenntnisse auf internationalen Tagungen (ASCO-conference). Heute verfügt die

Gruppe über die wohl umfangreichste Erfahrung auf diesem Gebiet. Ihre Erfolge bei der Tumortherapie sind komplementär zu anderen Therapien, erfassen daher auch bisher therapierefraktäre Fälle, Knochen- und Hirnmetastasen.

Pionierarbeit leistete die Gruppe im weiteren Verlauf in der Steuerung der Abwehrreaktion durch „*danger*“-Signale, in der Beladung der Dendritischen Zellen nicht in der Zellkultur, sondern im Körper, so z.B. durch die Injektion in den Tumor. Die Präparation und Standardisierung der Dendritischen Zellen wurde in eigenen Verfahren optimiert, die Steuerung der Differenzierung von Dendritischen Zellen in der Kultur durch sequentielle Applikation von TLR-Liganden zum Patent angemeldet.

Die spannende Suche nach dem Mechanismus der Immunstimulation in Erstbeschreibungen durch die Arbeitsgruppe Peters Jahrzehnte unabhängiger Entdeckungen

Erstbeschreibung der Zellmembran-Transporter für Nucleoside und Zucker bei Lymphozyten und ihrer minutenschnellen Aktivierung nach Mitogen-Bindung: früheste Ereignisse der Immunaktivierung

Peters, J.H., P. Hausen: Effect of phytohemagglutinin on lymphocyte membrane transport. 1. Stimulation of uridine uptake. Eur. J. Biochem. 19 (1971) 502-508

Peters, J.H., P. Hausen: Effect of phytohemagglutinin on lymphocyte membrane transport. 2. Stimulation of "facilitated diffusion" of 3-O-methyl-glucose. Eur. J. Biochem. 19 (1971) 509-513

Erste Messungen von Zellkontakt-Abhängigkeit der Lymphozyten-Stimulation Hypothese der Zellkontakt-Abhängigkeit der Lymphozytenstimulation

Peters, J.H.: Contact cooperation in stimulated lymphocytes.

I. Influence of cell contact on unspecifically stimulated lymphocytes. Exptl. Cell Res. 74 (1972) 179-186

Huelser, D.F., J.H. Peters: Contact cooperation in stimulated lymphocytes.

II. Electrophysiological investigations on intercellular communication. Exptl. Cell Res. 74 (1972) 319-326

Peters, J.H.: Membrane functions connected with the mitogenic activation of lymphocytes. In: Erythrocytes, Thrombocytes, Leukocytes. Recent Advances in Membrane and Metabolic Research. G. Thieme, Stuttgart (1973) pp 428-432

Heterogenität der kooperierenden Zellen

Peters, J.H.: On the hypothesis of cell contact mediated lymphocyte stimulation. In: K. Lindahl-Kiessling and D. Osoba (eds.), Lymphocyte recognition and effector mechanisms. Academic Press (1974) pp 13-17

Zweisinaltheorie der Lymphozytenstimulation

Während andere Gruppen nach einem einheitlichen Signal für die Lymphozytenstimulation suchten (Ca.-Einstrom, cyclo-AMP), zeigte die Gruppe Peters, daß ein Signal-Synergismus hierfür vorauszusetzen ist.

Peters, J.H., L. Schimmelpfeng: Cooperative pathway induction of T lymphocyte mitogen stimulation. Z. Immun. Forsch. 155 (1978) 169-182

Neue Methode der Gewinnung von dendritischen Zellen aus der Milz

Für diese Technik wurden in der Maus die Makrophagen durch ein Wanderungs- und Phagozytosesignal aus der Milz herausgelockt, übrig blieben die dendritischen Zellen.

Peters, J.H. Adherent cell heterogeneity (I): Non phagocytic adherent cells in mouse spleen. Immunobiology 157 (1980) 261 (Abstr.)

Erste Hybridome von dendritischen Zellen

Peters, J.H.:Hybridomas of mouse dendritic cells (DC) expressing phenotypic markers of DC including growth-stimulatory action on T-lymphocytes. In: K. Resch and H. Kirchner (eds.), Mechanisms of lymphocyte activation. Elsevier/North Holland, Amsterdam (1981) 537-540

1982: Entscheidung, Forschung an dendritischen Zellen von der Maus auf den Menschen umzustellen.

1987: Erster experimenteller Hinweis, daß dendritische Zellen aus Monozyten hergeleitet werden können.

Peters JH, Ruhl S & Friedrichs D: Veiled accessory cells deduced from monocytes. Immunobiol 176 (1987) 154-66

Der Begriff "dendritische Zelle" ist ausdrücklich in den Text aufgenommen. Im Titel wurde er von den Referenten nicht geduldet. Die Idee war nicht neu, denn Pathologen hatten schon morphologische Hinweise für diesen Werdegang beschrieben, konnten ihn aber nicht beweisen.

Suche nach der Signalgebung zur Differenzierung von dendritischen Zellen aus Monozyten

Najar HM, Bru-Capdeville AC, Gieseler RKH & Peters JH: Differentiation of human mono-cytes into accessory cells at serum-free conditions. Eur J Cell Biol 51 (1990) 339-46

Peters JH, Ruppert J, Gieseler RK, Najar HM, Xu H. Differentiation of human monocytes into CD14 negative accessory cells: do dendritic cells derive from the monocytic lineage? Pathobiology 1991;59:122-6.

Adenosin als erstes identifiziertes extrazelluläres Signal, vermittelt über den Adenosin-Rezeptor.

Zyklisches Adenosin Monophosphat (cAMP) als intrazelluläres Signal

Najar HM, Ruhl S, Bru-Capdeville AC & Peters JH: Adenosine and its derivatives control human monocyte differentiation into highly accessory cells versus macrophages. *J Leuk Biol* 47 (1990) 429-39

Peters JH, Börner T & Ruppert J: Accessory phenotype and function of macrophages induced by cyclic adenosine monophosphate. *Int Immunol* 2 (1990) 1195-202

Weitere extrazelluläre Signale, die an der Differenzierung beteiligt sind: Zytokine IL4, IL1, IL6

Ruppert J, Friedrichs D, Xu H & Peters JH: IL-4 decreases the expression of the monocyte differentiation marker CD14, paralleled by an increasing accessory potency. *Immunobiol* 182 (1991) 449-64

Ruppert J & Peters JH: Accessory cell function during monocyte/macrophage differentiation: relation to interleukin-1 (IL-1) production and release. *Eur J Cell Biol* 55 (1991) 352-61

Ruppert J & Peters JH: Interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 (IL-1) enhance the accessory activity of human blood monocytes during differentiation to macrophages. *J Immunol* 146 (1991) 144-9

Xu H, Friedrichs U, Gieseler RKH, Ruppert J, Ocklind G & Peters JH: Human blood dendritic cells exhibit a distinct T-cell-stimulating mechanism and differentiation pattern. *Scand J Immunol* 36 (1992) 689-96

Herkunft der dendritischen Zelle aus der myeloiden Reihe des Knochenmarks: Paradigmenwechsel

Die herrschende Lehrmeinung, die bis 1994 aufrechterhalten wurde, besagte, daß dendritische Zellen aus dem Knochenmark stammen, aber keiner der bekannten Linien angehören.

Ein zweites Paradigma war das der Makrophagenforscher, daß Makrophagen durch Phagozytose definiert sind und nicht-phagozytische Zellen somit keine Makrophagen sind.

Die Behauptung, daß dendritische Zellen aus der myeloiden Linie stammen ("Myeloid" = zur Linie der Monozyten, Makrophagen und Granulozyten gehörig), verletzte also beide Paradigmen.

Obwohl der Nachweis der Herkunft dendritischer Zellen aus Monozyten strikt eine "myeloide" Herkunft fordert, wurde dies nicht akzeptiert. Daher entschieden sich die Autoren, den Nachweis noch einmal direkt an Knochenmark-Zellen der Ratte zu führen. So konnten sie erstmalig die myeloide Herkunft der dendritischen Zellen auch direkt beweisen.

Gieseler RKH, Röber R-A, Kuhn R, Weber K, Osborn M & Peters JH: Dendritic accessory cells derived from rat bone marrow precursors under chemically defined conditions in vitro belong to the myeloid lineage. *Eur J Cell Biol* 54 (1991) 171-81

1992: Internationale Konferenz über dendritische Zellen in Amsterdam.

Vollständige Zytokin-Kombination,

Beweisführung unter definierten (serumfreien) Bedingungen

Kombination von GM-CSF und IL-4 zur Bildung dendritischer Zellen aus Monozyten erstmals beschrieben. Veröffentlicht in den Konferenz-Proceedings 1993

Peters JH, Xu H, Ruppert J, Ostermeier D, Friedrichs D & Gieseler RKH: Signals required for differentiating dendritic cells from human monocytes in vitro. *Adv Exp Med Biol* 329 (1993) 275-80

Ruppert J, Schütt C, Ostermeier D & Peters JH: 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 (1993); 281-6

Xu H, Friedrichs U, Gieseler RKH, Ruppert J, Ocklind G & Peters JH: Distinct T cell stimulation mechanism and phenotype of human blood dendritic cells. *Adv Exp Med Biol* 329 (1993) 93-8

Paradigmenstreit: Monozyten-Subpopulationen versus Plastizität

Monozyten lassen sich nicht 100%ig rein darstellen. Daher könnten Dendritische Zellen auch aus begleitenden nicht-monozytären Vorläufern entstehen, die die Population der Monozyten kontaminieren. Alternativ könnten sie aus kleinen Subpopulationen der Monozyten entstehen. Hier kann die hohe Ausbeute an Dendritischen Zellen aber nur die Zusatzannahme einer starken Proliferation erklärt werden. Sie wurde nie beschrieben. Dasselbe gilt für monozytäre Subpopulationen: Die These von starren Monozyten-Subpopulationen, die bereits für die Differenzierung zu Makrophagen, Dendritischen Zellen, Osteoclasten, Endothelien etc. prädestiniert sind, konnte bis heute nicht bewiesen werden.

Die einfache Tatsache, daß eine Monozyten-Population quantitativ, d.h. zu 80-90% entweder zu Makrophagen oder zu Dendritischen Zellen differenziert werden kann, bedeutet zwingend, daß die Monozyten, wie von Peters postuliert, „plastische“ Zellen sind.

Peters JH, Gieseler R, Thiele B & Steinbach F: Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants. *Immunol Today* 17 (1996) 273-8

Interferon-gamma

Sehr früh wurde auch Gamma-Interferon (IFN- γ) als wichtiges Zusatz-Signal gefunden, das erst Jahre später wieder als Polarisierungsfaktor in die Diskussion eingeführt wurde.

Xu H, Krämer M, Spengler H-P & Peters JH: 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 (1995) 75-8

Dies führte zu der Vorstellung, daß es zwei Alternativen für die Ausdifferenzierung von Dendritischen Zellen gibt (heute "Polarisierung" genannt), repräsentiert durch den Einfluß von Th1- und Th2-Zytokinen.

Gieseler R, Heise D, Soruri A, Schwartz P & Peters JH: In-vitro differentiation of mature dendritic cells from human blood monocytes. *Develop Immunol* 6 (1998) 25-39

Differenzierung

Die Umwandlung von Monozyten zu Dendritischen Zellen ist ein Differenzierungsprozeß. Damit werden Monozyten zu "plastischen", vielleicht auch pluripotenten Zellen. "Transdifferenzierung" ist der aktuelle Begriff hierfür. Schon 1990 gibt es Belege für diese Betrachtungsweise:

Najar HM, Ruhl S, Bru-Capdeville AC & Peters JH: Adenosine and its derivatives control human monocyte differentiation into highly accessory cells versus macrophages. *J Leuk Biol* 47 (1990) 429-39

Erst kürzlich wurde der Prozeß der Transdifferenzierung zu dendritischen Zellen erneut dem Mechanismus der Eikosanoid-Bildung über den Stoffwechselweg der 5- vs. 15-Lipoxygenasen zugeordnet. In der schon oben zitierten Arbeit Gieseler et al. (1991), wurde bereits ein Protokoll vorgeschlagen, Dendritische Zellen über Linolsäure zu differenzieren. Der Prozeß über 5- vs. 15-Lipoxygenasen wurde ausführlich diskutiert:

Gieseler RKH, Röber R-A, Kuhn R, Weber K, Osborn M & Peters JH: Dendritic accessory cells derived from rat bone marrow precursors under chemically defined conditions in vitro belong to the myeloid lineage. *Eur J Cell Biol* 54 (1991) 171-81

Bei der Suche nach der Definition von „Differenzierung“ wurden Merkmale der Zellkern-Membran eingesetzt, die dem Begriff zuzuordnen sind.

Röber R-A, Gieseler RKH, Osborn M, Weber K & Peters JH: Induction of nuclear lamins A/C in macrophages in in vitro cultures of rat bone marrow precursor cells and human blood monocytes, and in macrophages elicited in vivo by thioglycollate stimulation. *Exp Cell Res* 190 (1990) 185-94

Gieseler RKH, Xu H, Schlemminger R & Peters JH: Serum-free differentiation of rat and human dendritic cells, accompanied by acquisition of the nuclear lamins A/C as differentiation markers. *Adv Exp Med Biol* 329 (1993) 287-91

Übersichtsarbeiten, Lehrbücher

Die Gruppe hat über die Jahre ihre Thesen und Befunde in Übersichtsarbeiten dargestellt. Bekannt wurde besonders die Arbeit in Immunology Today, die dann auch Eingang in Lehrbücher fand.

Peters JH, Ruppert J, Gieseler RKH, Najjar HM & Xu H: Differentiation of human monocytes into CD14 negative accessory cells: do dendritic cells derive from the monocytic lineage? *Pathobiol* 59 (1991) 122-6

Peters JH, Gieseler R, Thiele B & Steinbach F: Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants. *Immunol Today* 17 (1996) 273-8

Steinbach F, Gieseler R, Soruri A, Krause B & Peters JH: Myeloid DCs deduced from monocytes. In-vitro and in-vivo data support a monocytic origin of DCs. *Adv Exp Med Biol* 417 (1997) 27-32

Goldsby R.A., T.J. Kindt, Barbara A. Osborne: *Kuby Immunology*, 4th Ed. 2000 p. 46