

1 ZUSAMMENFASSUNG

Dendritische Zellen sind die Initiatoren spezifischer Immunantworten. Die Langerhans-Zelle (LC) aus der Epidermis gilt als der Prototyp einer dendritischen Zelle im unreifen Zustand. Von allen dendritischen Zellen wurde die LC zuerst beschrieben und viele grundlegende Erkenntnisse über dendritische Zellen wurden aus Versuchen mit LC gewonnen. Diese seltenen Zellen lassen sich nur mit hohem präparativem Aufwand aus der Epidermis isolieren. Alternativ wird der Großteil der Experimente in der DC-Forschung heute mit einer in der Kultur generierten, also artifiziellen dendritischen Zelle betrieben. Es häufen sich jedoch die Hinweise, dass sich diese Zellen in Phänotyp und funktionellen Eigenschaften von LC aus der Haut unterscheiden.

LC sind in ihrer epidermalen Umgebung dem Angriff pathogener Mikroorganismen ausgesetzt. Über die Stimulation von Toll-Rezeptoren, die spezifische molekulare Muster verschiedener Erregerklassen erkennen, ist bei LC bis heute nichts bekannt. Ebenfalls nicht untersucht ist die Expression neu beschriebener inflammatorischer Zytokine. Auch Mikrochip-Analysen von LC-ähnlichen Zellen werden in dieser Arbeit erstmals publiziert. Die Ergebnisse meiner Arbeit lassen sich in folgenden Punkten zusammenfassen:

1. Über magnetische Zellsortierung mit CD1c konnten viable epidermale LC in bislang nicht erreichter Reinheit isoliert werden. Die angereicherten Zellen reiften nicht spontan aus und erwarben nach Stimulation die funktionelle Kapazität, T-Zellen in die Proliferation und zur Sekretion von IFN- γ zu bringen.
2. Elektronenmikroskopische Analysen zeigten direkten Membrankontakt von LC und CD40L⁺Zellen. Die LC zeigten morphologisch deutliche Anzeichen von Zellaktivierung.
3. Eine Kostimulation mit CD40-Ligand war die Voraussetzung, dass TLR-Liganden das Zytokin IL-12p70 in LC induzieren konnten. Dabei produzierten epidermale LC geringere Mengen dieses T_H1-Zytokins als LC, die aus Monozyten in Kultur generiert wurden (MoLC).

4. Bei TLR-Stimulation setzten LC mit IL-12 und IL-10 inflammatorische und anti-inflammatorische Zytokine frei.
5. Erstmals wurde eine Expression der neu beschriebenen Zytokine IL-27 und IL-18 in LC gefunden. Das Gen von GM-CSF konnte in epidermalen LC aktiviert werden. TGF- β wurde konstitutiv exprimiert.
6. Das Antigen CD1c eignete sich ebenfalls, um aus der Gesamtpopulation der MoLC die Subpopulation anzureichern, die im stimulierten Zustand das kostimulatorische Molekül CD80 exprimierte. Die CD1c-negativen MoLC ließen sich am wenigsten stimulieren. *In vitro* generierte dendritische Zellen, die in aktuellen klinischen Studien eingesetzt werden, stellen also eine Mischpopulation dar. Über CD1c-Sortierung konnten optimale T-Zell-reaktive APC gewonnen werden.
7. Stimulierte LC und CD1c⁺MoLC verstärkten in ähnlichem Ausmaß die Expression von CD83 und CD86. Die Profile von CD80, CD54 und HLA-DR unterschieden sich dagegen deutlich.
8. Mikroarray-Experimente und RT-PCR detektierten Expressionen von TNF- α , IL-1 β , GM-CSF, IL-6 und IL-8 in CD40L- und LPS-stimulierten CD1c⁺MoLC. Über die Expression von NF- κ B, RelB, STAT5 und BclX und Bcl-A1 wurden Gene der Zellaktivierung und des Anti-Apoptose-Programms induziert. Das Expressionsprofil repräsentierte deutlich eine Entzündungsreaktion.

Die Vergleichsstudien von MoLC mit LC als Modell einer *ex vivo*-isolierten dendritischen Zelle ergaben neue Erkenntnisse über die funktionelle Kapazität von LC. Dendritische Zellen, generiert aus Monozyten oder Vorläufer-Zellen, werden bereits bei Therapien von Tumor- und Autoimmunerkrankungen eingesetzt (STEINMAN, 2003). Die Befunde über natürliche dendritische Zellen ermöglichen Fortschritte in der Immuntherapie mit dendritischen Zellen.

1 SUMMARY

Dendritic cells are the initiators of specific immune responses. The epidermal Langerhans cell (LC) is considered to be the prototype of a dendritic cell in an immature state. The LC was the first described dendritic cell and a lot of fundamental findings about dendritic cells were gained by experiments with LCs. These rare cells can only be isolated from the epidermis by high preparative effort. Today, the majority of experiments in DC-research is done with artificial dendritic cells generated in culture. However, there are many indications for phenotypical and functional differences of these cells and LCs derived from skin.

In their epidermal environment LCs are exposed to the attack of pathogenic microorganisms. Up to this day, in LCs nothing is known about stimulation of toll-like receptors recognizing specific molecular patterns of different pathogens. The expression of newly identified inflammatory cytokines is also not explored. In this study, microchip analyses of LC-like cells are published for the first time as well. The results of my work can be summarized as follows:

1. Viable epidermal LCs could be isolated via CD1c by magnetic cell sorting at a purity that was not achieved before. The purified cells did not mature spontaneously but gained the functional capacity to induce T cell proliferation and IFN- γ secretion only after stimulation.
2. Electron microscopical analyses revealed direct membrane contact between LCs and CD40L⁺ cells. LCs exhibited obvious morphological marks of cell activation.
3. Costimulation with CD40 ligand was the basic requirement for the induction of the cytokine IL-12p70 in LC by TLR ligands. Epidermal LCs produced lower amounts of this T_H1 cytokine than did LCs generated in culture from monocytes (MoLCs).
4. After TLR stimulation, LCs secreted both inflammatory IL-12 and anti-inflammatory IL-10.

5. An expression of the newly identified cytokines IL-27 and IL-18 was found for the first time in LCs. LC activation induced the transcription of GM-CSF. TGF- β was constitutively expressed.
6. The antigen CD1c was also suited for the enrichment of a subpopulation of MoLCs which expressed the costimulatory molecule CD80 after stimulation. The CD1c-negative MoLCs were resistant to stimulation. *In vitro* generated dendritic cells that are used in current clinical trials therefore represent a mixed cell population. Optimal T cell-reactive APCs could be obtained by CD1c sorting.
7. The expression of CD83 and CD86 was equally enhanced in stimulated LCs and CD1c⁺MoLCs. However the profiles of CD80, CD54, and HLA-DR showed significant differences.
8. Microarray experiments and RT-PCR revealed the expression of TNF- α , IL-1 β , GM-CSF, IL-6, and IL-8 in CD40L- and LPS-stimulated CD1c⁺MoLCs. Genes of cell activation and of the anti-apoptosis program were induced by the expression of NF- κ B, RelB, STAT5 and BclX and Bcl-A1. The expression profile obviously represents an inflammatory reaction.

The comparative studies of MoLCs and LCs as a model for an *ex vivo*-isolated dendritic cell gave new insights on the functional capacity of LCs. At this time, dendritic cells generated from monocytes or precursor cells are used in therapies of tumour- and autoimmune diseases (STEINMAN, 2003). The findings on natural dendritic cells will enable proceedings in immunotherapy with dendritic cells.