

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Zusammenfassung/Summary.....	1
2 Einleitung.....	5
2.1 Dendritische Zellen	6
2.1.1 Morphologie und Vorkommen	6
2.1.2 Ontogenese und Zelltypen.....	8
2.1.3 Angeborenes Immunsystem: Toll-Rezeptoren, andere PRR und Zytokine der IL-12-Familie	9
2.1.4 Endozytose und Transport von Peptid:MHC-I/II-Komplexen bei unreifen Zellen.....	11
2.1.5 Die Reifung von dendritischen Zellen	13
2.1.6 Priming, Proliferation und Polarisierung von naiven T-Zellen	14
2.1.7 Aktivierung von Gedächtnis-, NK- und CD1-spezifischen T-Zellen	15
2.2 Aufbau von Haut und Epidermis.....	16
2.3 Immunologische Vorgänge in der Haut.....	17
2.4 LC, die zuerst beschriebenen dendritischen Zellen bleiben rätselhaft	18
2.5 Auswanderung aus der Epidermis zu den regionalen Lymphknoten.....	20
2.6 Das Modell der Immun-Überwachung in der Haut.....	21
2.7 Generierung von LC aus Monozyten und CD34 ⁺ Vorläufer-Zellen	23
2.8 Präsentation von Lipid-Antigen über CD1-Moleküle	24
2.9 Magnetische Zell-Sortierung (<i>magnetic cell sorting</i> , MACS).....	25
2.10 Aufgabenstellung.....	26
3 Material und Methoden.....	28
3.1 Zellbiologisches Material und Arbeitstechniken	28
3.1.1 Humane Haut.....	28
3.1.2 Humanes Blut	28
3.1.3 Zelllinien	28

3.1.4	Medien, Medienzusätze und zellbiologische Arbeitstechniken	28
3.1.5	Gefahren-Signale, Superantigene und Zytokine für Stimulationen.....	29
3.1.6	Kultur- und Stimulationbedingungen	30
3.1.7	Präparation von humanen Epidermiszellen.....	30
3.1.8	Magnetische Sortierung von LC mit Anti-CD1a Mikrobeads	32
3.1.9	Weitere Sortierungsmethoden für LC	33
3.1.10	Isolierung von PBMC aus <i>buffy coat</i> über Dichtegradientenzentrifugation	34
3.1.11	Kryopreservation und Auftauen von Zellen.....	35
3.1.12	Isolierung von Monozyten aus PBMC durch Adhärenz	36
3.1.13	Isolierung von Monozyten durch Depletion anderer PBMC-Populationen	37
3.1.14	Isolierung von CD4 ⁺ T Zellen durch Depletion anderer PBMC-Populationen....	38
3.1.15	Generierung von dendritischen Zellen und LC aus Monozyten.....	38
3.1.16	Kokultur mit CD40L ⁺ Zellen und Ernten der Zellen	39
3.2	Durchflusszytometrie.....	40
3.2.1	Färbung der Zellen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern	42
3.2.2	Messung der Zellen und Analyse.....	45
3.3	Zytokinmessung im Sandwich-ELISA.....	46
3.4	Lymphozyten-Proliferation in der allogenen MLR.....	49
3.5	Morphologische Analyse in der Transmissions-Elektronenmikroskopie.....	51
3.6	Molekularbiologische Techniken.....	53
3.6.1	Extraktion von Gesamt-RNA	53
3.6.2	Konzentrationsbestimmung über RiboGreen	54
3.6.3	cDNA-Synthese	55
3.6.4	Semi-quantitative Analyse in der RT-PCR	56
3.6.5	Expressionsanalyse mit cDNA-Mikroarray	59
4	Ergebnisse	62
4.1	MACS-Isolierung mit CD1a/CD1c und phänotypische/funktionelle Charakterisierung von LC aus der humanen Haut.....	62
4.1.1	Ein Antikörper gegen CD1a separiert hochreine HLA-DR ⁺ Zellen aus der Gesamtpopulation epidermaler Zellen	62
4.1.2	Die CD1a-isolierten Zellen entsprechen phänotypisch humanen LC.....	64
4.1.3	Alle isolierten Zellen zeigen in der TEM die typische Morphologie von LC	

mit BG und gleichzeitig Oberflächen- und intrazelluläre CD1a-Expression.....	67
4.1.4 Ein Antikörper gegen CD1c erhöht gegenüber Anti-CD1a die Zellausbeute und isoliert eine vergleichbare Population von CD1a ⁺ / HLA-DR ⁺ Zellen	69
4.1.5 CD1a- und CD1c-isolierte LC unterscheiden sich von Migrations-LC.....	69
4.1.6 Isolierte LC exprimieren inflammatorische Zytokine nach Stimulation	71
4.1.7 Isolierte LC besitzen die stimulatorische Kapazität funktionell intakter LC.....	73
4.2 Viabilität und phänotypische Veränderungen in der Zellkultur.....	75
4.2.1 LC überleben in der Langzeitkultur in Anwesenheit von Serum	75
4.2.2 Ein Teil der LC geht in die spontane Apoptose, Stimuli können die Viabilität der LC erhalten	77
4.2.3 LC exprimieren CD83 und B7 auf geringem Niveau und konstant in der Zellkultur	78
4.3 Stimulation von isolierten LC im direkten Vergleich mit generierten Zellen des MoLC-Modells	80
4.3.1 LC und MoLC exprimieren CD40 auf vergleichbarem, CD1a und HLA-DR auf unterschiedlichem Niveau.....	80
4.3.2 LC zeigen in der Ultrastruktur nach Ligation von CD40 Anzeichen von Zellaktivierung.....	82
4.3.3 Nach Stimulation werden große Mengen IL-12 von MoLC, IL-10 auch von LC sezerniert.....	84
4.3.4 CD83 wird auf MoLC und auf epidermalen LC in Abhängigkeit vom Stimulus unterschiedlich induziert.....	86
4.3.5 Kreuzbindung von CD40 reguliert CD80, CD54 und HLA-DR in CD1c ⁺ LC hoch.....	87
4.3.6 Ligation von CD40 auf MoLC und LC verstärkt die stimulatorische Kapazität in der MLR	89
4.4 Analyse der Genexpression von MoLC nach Simulation mit LPS und CD40L mittels Mikroarray	90
4.4.1 Qualitätskontrollen im Bioanalyser zeigen intakte RNA von CD1c ⁺ MoLC	90
4.4.2 Auf dem Mikroarray werden 60 Gene in stimulierten MoLC als differenziell exprimiert nachgewiesen.....	91
4.4.2.1 Der Genchip detektiert eine Expression inflammatorischer Zytokine	92
4.4.2.2 Der Genchip detektiert verstärkte Expression von kostimulatorischen	

Molekülen, Zytokin- und Chemokinrezeptoren	93
4.4.2.3 Der Genchip detektiert verstärkte Expression von Molekülen der Zellaktivierung und der Apoptose-Inhibition.....	94
5 Diskussion	95
5.1 Isolierungs-Methoden: MACS mit CD1a und CD1c	96
5.2 Phänotyp der isolierten Zellen	99
5.3 Stimulation von T-Helferzellen.....	101
5.4 Zytokinsekretion der isolierten Zellen.....	101
5.5 Stimulation von LC und MoLC	105
5.6 Phänotyp und Zytokin-Freisetzung von stimulierten LC	106
5.7 Phänotyp und Zytokin-Freisetzung von stimulierten MoLC	108
5.8 Expressionsanalyse von stimulierten MoLC mit Mikroarray.....	110
5.9 Ausblick	112
6 Literaturverzeichnis	113
Publikationen	138
Kongressbeiträge	138
Lebenslauf	140