

2 EINLEITUNG

„Sie liegen verborgen - ihre langen, Tentakel-ähnlichen Arme ausgestreckt - in allen Geweben unseres Körpers, die mit der Umwelt interagieren. In den Schleimhäuten unserer Nase und der Lungen, wenn wir das *Influenza* Virus in einem überfüllten U-Bahn Wagen einatmen. In unserem Gastrointestinaltrakt, um das Immunsystem zu alarmieren, wenn wir eine Dosis *Salmonella*-Bakterien verschlucken. Und vor allen Dingen, in unserer Haut, wo sie als Wächter heimlich auf der Lauer liegen, sollten Mikroben in die lederne Festung unserer Epidermis eindringen. Sie sind dendritische Zellen ...“ (BANCHEREAU, 2002).

Und da diese wohl wichtigsten Zellen des menschlichen Immunsystems so im Verborgenen meist erfolgreich ihrer Arbeit nachgehen, waren sie bei ihrer Auffindung in den peripheren Lymphorganen der Maus durch STEINMAN UND COHN 1973 auch die mit als letzte entdeckte Population von Immunzellen. Die wissenschaftlichen Auseinandersetzungen über ihre Identität überhaupt und ihre Abgrenzung von den anderen potenziell antigenpräsentierenden Zellen, den Makrophagen und B-Zellen, währte lange Zeit. Heute jedoch steht außer Frage, dass die dendritische Zelle *in vivo* die meisten T-Zell-Antworten induziert, da sie die einzige Zelle ist, die in Abwesenheit von aktivierten T-Zellen professionell Antigen präsentieren und gleichzeitig T-Zellen kostimulieren kann (JANEWAY ET AL., 2001). Die dendritische Zelle fungiert über die Verbindung von Phagozytose und Antigenpräsentation als Schaltstelle zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem. Gerade deswegen ist sie auch primäres Zielobjekt, Vehikel und Vermehrungsreservoir von pathogenen Krankheitserregern. HI-, Cytomegalie-, Dengue- oder Masern-Viren haben spezielle Tarn- und Fluchtmechanismen in und vor dendritischen Zellen entwickelt. Darüber hinaus hat ein Nicht-Erkennen durch dendritische Zellen von maskierten oder abgeworfenen Tumor-assoziierten Antigenen auf entarteten Zellen mit dem Ausbleiben von Immunität gegen den Tumor fatale Folgen für den Organismus.

Eigentlich wurde die dendritische Zelle über 100 Jahre früher entdeckt. Einem jungen Medizinstudenten fiel 1868 in Berlin die ungewöhnliche Morphologie dieser Zelle der Epidermis im Anatomiekurs auf (LANGERHANS, 1868). Er färbte sie mit Goldchlorid an, einer damals gebräuchlichen Technik zur Identifizierung von Nervenzellen. Als solche wurden die nach seinem Entdecker benannten Langerhans-Zellen (LC) danach auch betrachtet. Zeitweilig

galten sie in den 50er Jahren als Melanozyten ohne Melaninproduktion und auch als spezialisierte Makrophagen, bis sich schließlich Gerold Schuler und Ralph M. Steinman nach einem Treffen 1985 an der Rockefeller Universität darüber einig werden konnten, dass man es bei den LC mit einem verkannten Mitglied der Familie der dendritischen Zellen zu tun hatte (ROMANI ET AL., 2003). So ist der Großteil der Erkenntnisse über die Biologie dendritischer Zellen durch Forschung an LC als Modellzelle aus der Epidermis von Maus und Mensch zusammengetragen worden (GIROLOMONI ET AL., 2002). Erst in den letzten Jahren ist es möglich geworden, mit Hilfe von komplexen Isolierungs-Protokollen auch andere, ebenso rare Vertreter dieser Zellfamilie aus Gewebe oder Blut zu gewinnen.

2.1 Dendritische Zellen

2.1.1 Morphologie und Vorkommen

Mit ihrem sternartig verzweigten Zellkörper sind dendritische Zellen prädestiniert, sich im Gewebe durch Extension und Retraktion ihrer Fortsätze zu bewegen. Außerdem bieten diese nach Vorkommen unterschiedlichen, entweder langen dünnen oder astartig verdickten Zytoplasma-Protrusionen eine große Kontaktfläche für die Aufnahme von Antigen und die Adhäsion an naive Lymphozyten (BANCHEREAU UND STEINMAN, 1998). Dendritische Zellen sind mit einem Anteil von 0,2 % der Leukozyten im Blut und noch geringeren Anteilen in einigen Geweben sehr seltene Zellen. Dabei kommen verschiedene Typen dendritischer Zellen in fast allen Organen und Geweben vor. Heute ist ihre Gewebeverteilung für die Maus und den Menschen gut beschrieben. In der Haut sind LC und dermale dendritische Zellen in Epidermis und Dermis vertreten (ROMANI ET AL., 2003).

Da der respiratorische Trakt in besonderem Maße Luftkeimen ausgesetzt ist, müssen dendritische Zellen für die Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase in der Lunge intensiv Antigene sammeln und zu den T-Zellen des zentralen Immunsystems transportieren (HOLT ET AL., 1999). Im Darm sind intestinale dendritische Zellen einem Antigen-Ansturm in Form von Nahrung, kommensalen und pathogenen Bakterien, Viren, Parasiten und auch Prionen ausgesetzt. Dendritische Zellen induzieren dort Immunantworten in den Peyer'schen Plaques, den mesenterialen Lymphknoten und der Lamina propria der intestinalen Villi

(MACPHERSON ET AL., 1999). Dendritische Zellen sind ebenso an Transplantat-Abstoßungsreaktionen beteiligt, wenn die parenchymatischen Organe Leber, Nieren, Herz und Bauchspeicheldrüse im Empfängerorganismus nicht für lange Zeit toleriert werden (STEPTOE UND THOMSON, 1999).

Auch in immun-privilegierten Regionen sind dendritische Zellen zu finden: im ZNS und in der vorderen Augenkammer. Diese Gewebe sind nicht regenerativ und es kommen in ihnen keine Lymphdrainage und MHC-I/II-Moleküle vor (MCMENAMIN UND FORRESTER, 1999).

In der Medulla des primären Lymphorgans Thymus eliminieren lymphoide dendritische Zellen bei der negativen Selektion autoreaktive, reife Thymozyten durch Apoptose (zentrale Toleranz, BROCKER ET AL. 1997). Im sekundären Lymphorgan Milz können mit den interdigitierenden dendritischen Zellen (IDC) Subtypen der lymphoiden und der myeloiden Linie gefunden werden. Lymphoide dendritische Zellen haben eine geringe Kompetenz, T-Zellen zu stimulieren, und üben über die Expression von FasL eine regulatorische Funktion aus (SUSS UND SHORTMAN, 1996). Dendritische Zellen myeloider Herkunft gelangen über den Blutweg in die T-Zell-Areale der weißen Milz-Pulpa (PALS), wo sie durch Adhäsion an naive T-Zellen viabel zurückgehalten werden (AUSTYN, 1999). In den B-Zell-Zonen der Milz sind folliculäre dendritische Zellen (FDC) lokalisiert. Anders als andere dendritische Zellen phagozytieren sie nicht, exprimieren keine MHC-II-Moleküle und gehören nicht zu den Leukozyten.

Auch im Lymphknoten können verschiedene Subpopulationen gefunden werden: interdigitierende retikuläre dendritische Zellen im inneren Cortextbereich der T-Zell-Areale und nicht-lymphoide dendritische Zellen, die aus den Epithelien oder aus dem Blut eingewandert sind (AUSTYN, 1999). In den Tonsillen, der Milz und den Lymphknoten schließlich kommen auch dendritische Zellen vor, die weder der lymphoiden noch der myeloiden Abstammungslinie eindeutig zugewiesen werden können. Dagegen entwickeln sich aus Vorläufer-Zellen mit lymphoiden Linienmarkern die plasmazytoiden dendritischen Zellen, deren Viabilität von der Präsenz des Interleukins (IL)-3 abhängig ist und die bei viraler Infektion große Mengen Interferon (IFN)- α produzieren (SIEGAL ET AL., 1999).

2.1.2 Ontogenese und Zelltypen

Ihren Bildungsort haben alle Typen dendritischer Zellen im Knochenmark. Entscheidende Wachstumsfaktoren sind Flt-3 Ligand und GM-CSF. Unter deren Einfluss differenzieren aus $CD34^+$ hämatopoetischen Stammzellen lymphoide ($IL-7R^+$) und myeloide ($c-kit^+$) Vorläuferzellen (LIU ET AL., 2001; MANZ ET AL., 2001). Noch im Knochenmark bilden sich in der myeloiden Linie CLA^+ (*cutaneous lymphocyte associated antigen*) und CLA^- Vorläufer aus (Abb. 1). Erstere wandern als LC in die Epidermis, aus CLA^- Vorläufern entwickeln sich $CD1a^-$ Zellen, die als interstitielle dendritische Zellen die Dermis und andere Gewebe besiedeln.

LC und interstitielle dendritische Zellen zeigen beide den myeloiden Marker CD11c und können im unreifen Stadium nach der *steady state*-Migration in den Lymphknoten Selbstantigene von apoptotischen Zellen präsentieren (STEINMAN ET AL., 2000). Die dort induzierten regulatorischen T-Zellen (T_{Reg} , früher als Suppressorzellen bezeichnet) vermitteln als Antwort auf die Präsentation des Selbstantigens zusammen mit geringer Kostimulation Toleranz. Bei Infektion und Entzündung können reife LC und interstitielle dendritische Zellen nach Fremdartigen-Aufnahme unmittelbar in die drainierenden Lymphknoten wandern und dort primäre Immunreaktionen auslösen.

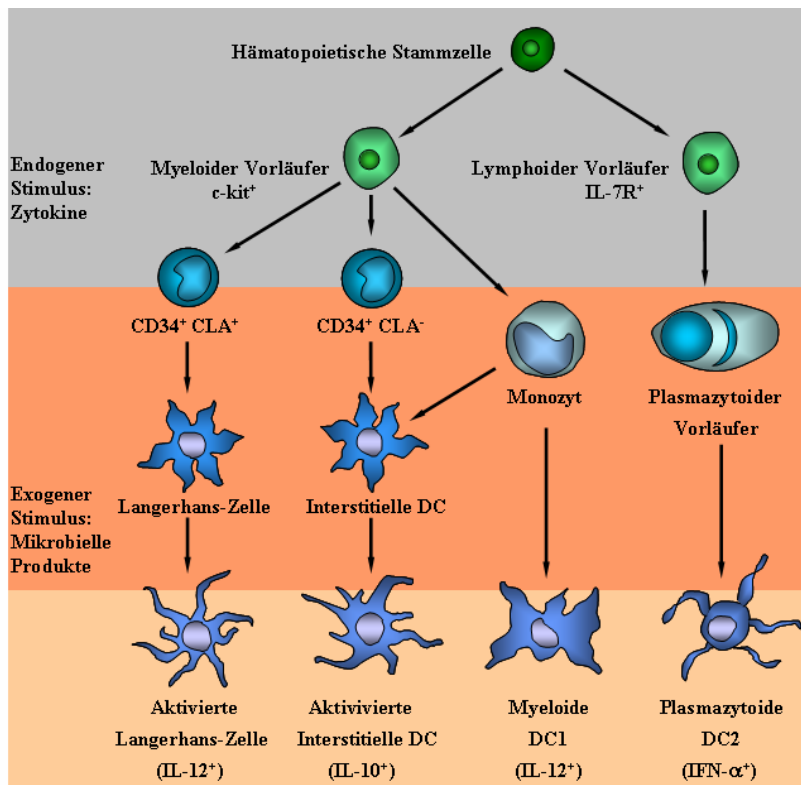


Abb. 1. Entwicklungswege der humanen dendritischen Zellen. Unter dem Einfluss von Zytokinen differenzieren Vorläufer zu LC und dendritischen Zellen in einem ruhenden Zustand (phänotypische Reifung). Monozyten und plasmazytoide Vorläufer bleiben unter dem endogenen Einfluss von Zytokinen in einem weniger differenzierten Zustand. Dendritische Zellen myeloider und lymphoider Herkunft benötigen Produkte von Bakterien oder Viren um aktiviert (funktionelle Reifung) zu werden (CLA , *cutaneous lymphocyte associated antigen*; nach SHORTMAN UND LIU, 2002; verändert).

Aktiviert LC exprimieren IL-12 (KANG ET AL., 1996). Aktiviert interstitielle dendritische Zellen können IL-12 freisetzen, sind aber als Subpopulation einzigartig in der Potenz, auch IL-10 zu sezernieren (BANCHEREAU ET AL., 2003).

Die CD34⁺Stammzellen können im Knochenmark zu zwei weiteren Vorläufer-Zellen differenzieren: zu myeloiden (CD14⁺ und CD11c⁺) Monozyten und zu lymphoiden (prä-Tα⁺), plasmazytoiden Vorläufer-Zellen (SHORTMAN UND LIU, 2002). Monozyten können im Blut Bakterien phagozytieren. In Abhängigkeit von LPS aus der Bakterienzellwand können Monozyten dann zu Makrophagen differenzieren. Anders verhält es sich bei Bakterienkontakt in der Präsenz von inflammatorischen Zytokinen wie GM-CSF. In dieser Situation differenzieren Monozyten zu dendritischen Zellen vom DC1-Typ (SALLUSTO UND LANZAVECCHIA, 1994; ROMANI ET AL., 1994). Diese sind zur Produktion großer Mengen des inflammatorischen Zytokins IL-12 befähigt, werden durch GM-CSF stimuliert und exprimieren die Toll-Rezeptoren 2, 3, und 4 (ITO ET AL., 2002; GILLIET ET AL., 2002; MUZIO ET AL., 1998).

Dagegen differenzieren virus-infizierte Vorläufer-Zellen zu plasmazytoiden, IFN-α produzierenden dendritischen Zellen (DC2). Charakteristischerweise exprimieren plasmazytoide Zellen das Molekül BDCA-2 und können über den Toll-Rezeptor 9 durch bakterielle DNA und nicht-methylierte CpG Desoxy-Oligonukleotide stimuliert werden (DZIOEK ET AL., 2001; KRUG ET AL., 2001). In der Maus werden noch CD8⁺CD4⁻ von CD8⁻CD4⁺dendritischen Zellen unterschieden. Erstere können selektiv tote Zellen aufnehmen, haben aber kein direktes Äquivalent bei humanen dendritischen Zellen, die kein CD8-Molekül auf der Zelloberfläche tragen.

2.1.3 Angeborenes Immunsystem: Toll-Rezeptoren, andere PRR und Zytokine der IL-12-Familie

Außer ihrer zentralen Rolle in der Einleitung von spezifischer Immunität und Toleranz, und damit bei der adaptiven Antwort, sind dendritische Zellen auch in Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems involviert. Nach der Gefahren-Hypothese bedarf die Reifung dendritischer Zellen als Voraussetzung für die Induktion einer T-Zell-Antwort so genannter

Gefahren-Signale (MATZINGER, 1994). Diese Hypothese postuliert, dass immunologische Reaktionen nicht gegen "Fremdes" allein, sondern nur gegen "Fremdes im Kontext mit endogenen oder exogenen Faktoren" ausgelöst werden. Zu den endogenen Faktoren werden die Moleküle TNF- α , IL-1 β und CD40-Ligand gezählt, die vom Gewebe bei Stress, Verletzung und Nekrose freigesetzt werden.

Einige Pathogenklassen haben molekulare Gemeinsamkeiten, wie z. B. in Lipopolysaccharid (LPS) als Bestandteil der Bakterienzellwand. Diese *pathogen-associated-molecular-patterns* (PAMP) können vom Immunsystem des Wirts sehr früh nach der Invasion als exogene Gefahren-Signale erkannt werden. PAMP haben Ligandenfunktion für die *pattern recognition receptors* (PRR). Diese evolutionär konservierten Rezeptor-Proteine umfassen u. a. den Mannose-Rezeptor (MR), das HIV-1 bindende Lektin DC-SIGN (*DC-specific ICAM-3 grabbing non-integrin*) und Toll-Rezeptoren (TLR, *toll-like receptors*). Zurzeit sind 11 TLR kloniert, ihre Liganden sind noch nicht vollständig erfasst. Von den Erregerklassen-spezifischen Liganden sind folgende identifiziert: Peptidoglykan und Lipoteichonsäure für TLR2 (SCHWANDNER ET AL., 1999), doppelsträngige (ds)RNA für TLR3, LPS von gram-negativen Bakterien für TLR4 (CHOW ET AL., 1999), Flagellin für TLR-5 (HAYASHI ET AL., 2001), GU-reiche, einzelsträngige (ss)RNA für TLR7 und TLR8 (HEIL ET AL., 2004), unmethylierte DNA aus Bakterien und CpG-Oligonukleotide für TLR9 (HEMMI ET AL., 2000) und uropathogene Bakterien für TLR11 (ZHANG ET AL., 2004). Während bekannt ist, dass die Fraktion der CD11c⁺ dendritischen Zellen TLR2 und TLR4 und plasmazytoide dendritische Zellen TLR9 exprimieren (KADOWAKI ET AL., 2001), ist der TLR-Phänotyp von LC bei Maus und Mensch bis heute nicht untersucht.

Für die Übermittlung einer Gefahren-Information an naive T-Zellen können dendritische Zellen über Ligation von TLR und Aktivierung von NF- κ B die T_H1-polarisierenden Zytokine sezernieren. Eine starke Induktion und länger dauernde Freisetzung des pro-inflammatorischen IL-12p70 wird bei CD40L- und Bakterien-stimulierten dendritischen Zellen der myeloiden Linie beobachtet (SCHULZ ET AL., 2000). Auch intrazelluläre Parasiten, Pilze, dsRNA, bakterielle DNA und CpG-Oligonukleotide lösen signifikante IL-12-Antworten aus (MA UND TRINCHIERI, 2001). Weitere Mitglieder der IL-12-Familie sind die kürzlich beschriebenen Zytokine IL-23 und IL-27 (OPPMANN ET AL., 2000; PFLANZ ET AL., 2002). Wie IL-12 sind IL-23 und IL-27 heterodimere Proteine, die mit der Induktion der β 2-Untereinheit

des IL-12-Rezeptors und der Erhaltung der T_H1 -Effektorfunktion weitere Signale für die T-Zell-Polarisierung beisteuern (TRINCHIERI, 2003).

2.1.4 Endozytose und Transport von Peptid:MHC-I/II-Komplexen bei unreifen Zellen

Dendritische Zellen zeichnen sich durch ihre hohe Effizienz bei der Phagozytose von Pathogenen, der Prozessierung von antigenen Molekülen und der Präsentation von Peptiden im Kontext mit MHC-Molekülen der Klassen I und II aus. Unreife dendritische Zellen sind im Körper in den unteren Epithelschichten und in den Organen lokalisiert. Dabei ist der unreife Zustand durch starkes Vorkommen von Aktinspindeln und MHC-II-Molekülen in intrazellulären Lysosomen, den MHC-II-Kompartimenten (MIIC), gekennzeichnet. Auf der Zelloberfläche jedoch werden nur wenige MHC-II-Moleküle, wenige Adhäsionsmoleküle wie CD54 und CD58, wenige Moleküle, die T-Zellen kostimulieren können (CD40, CD80 und CD86), und kein CD83 exprimiert (BANCHEREAU UND STEINMAN, 1998).

Wenn pathogene Erreger in Gewebe eindringen, werden diese von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und auch von dendritischen Zellen phagozytiert. Extrazelluläre Antigene werden von dendritischen Zellen adsorptiv über Endozytoserezeptoren wie Fc γ R und Fc ϵ R, über das Multilektin DEC-205, den Makrophagen-Mannoserezeptor oder unspezifisch über den Vorgang der Makropinozytose aufgenommen. Anders als bei Makrophagen, die Proteine sofort nach der Internalisierung in ihre Aminosäure-Bestandteile zerlegen, findet in den Lysosomen dendritischer Zellen eine länger andauernde Prozessierung bei gleichzeitiger Formation der Antigen:MHC-II-Komplexe statt (TURLEY ET AL., 2000).

Nach der Antigenaufnahme können dendritische Zellen in Anwesenheit mikrobieller Produkte (**Abb. 1**) oder inflammatorischer Zytokine in einen reifen Zustand übergehen. In den reifenden dendritischen Zellen werden die MHC-II-Moleküle unter der Katalyse von HLA-DM-Molekülen mit Peptid-Antigenen beladen und bei schwacher Bindung wieder entfernt (*peptide editing*). Bei starker Bindung verlassen die Peptid:MHC-II-Moleküle in einem nur bei dendritischen Zellen gefundenden Transportweg die Lysosomen. Nach vorübergehendem Aufenthalt in Klasse-II-Vesikeln (CIIV) akkumulieren die Komplexe auf der Zelloberfläche und werden dort über Tage stabil exprimiert (CELLA ET AL., 1997).

In dendritischen Zellen reichen im Unterschied zu anderen Phagozyten nano- und picomolare Antigenkonzentrationen für effiziente Präsentation aus (SALLUSTO UND LANZAVECCHIA, 1995). Alternativ zu der direkten T-Zell-Präsentation können präsentierende dendritische Zellen selbst von anderen dendritischen Zellen phagozytiert werden (INABA ET AL., 1998) oder ihre lysosomalen Antigene in speziellen Vesikeln (Exosomen; THERY ET AL., 1999) weitergeben.

Ein Paradigma für die Einleitung der adaptiven Immunreaktion in Form von CD8⁺T-Zellen postuliert die Präsentation viraler Peptide auf MHC-I-Molekülen von Virus-infizierten dendritischen Zellen. Dafür werden Proteine im Zytosol durch das Immunoproteasom, einer multikatalytischen Protease-Formation, gespalten. Die Peptide gelangen dann über den Antigentransporter TAP (*transporters associated with antigen processing*) ins Lumen des ER und werden dort auf MHC-I-Moleküle geladen. Auch für MHC-I-Moleküle sind alternative Aufnahmewege von Peptiden bei dendritischen Zellen relevant. Über Integrine können andere, bei der Viruslyse in der Peripherie sterbende Zellen und Tumorzellen phagozytiert werden. Tumor- oder virale Antigene und auch exogene Peptide von anderen, nicht replizierenden Mikroorganismen können von dendritischen Zellen auf MHC-I-Moleküle geladen werden. Dieser Prozess wird als Kreuzpräsentation an CD8⁺T-Zellen oder auch als exogener Weg bezeichnet (ALBERT ET AL., 1998). Im Unterschied zum MHC-II-Weg können kreuzpräsentierte Antigene nach der Rezeptor-vermittelten Aufnahme aus dem endozytischen Kompartiment ins Zytosol entkommen, wo sie auf Proteasom und TAP treffen (RODRIGUEZ ET AL., 1999).

Wie oben angeführt, lösen dendritische Zellen tatsächlich fast alle T-Zell-Antworten *in vivo* aus. Diese Fähigkeit besitzen sie, da sie neben ihrer konstitutiven und im reifen Zustand hohen Expression kostimulatorischer Moleküle im Vergleich zu B-Zellen und Monozyten im Lymphknoten auch eine 10- bis 100-fach höhere Expression von Peptid:MHC-Komplexen aufweisen (INABA ET AL., 1997). Der T-Zell-Rezeptor besitzt eine relativ geringe Affinität von $\leq 1 \mu\text{M}$ zu seinem Liganden, dem Komplex Peptid:MHC-Molekül. Trotzdem kann bereits eine dendritische Zelle wegen des hohen Besatzes mit MHC-Molekülen 100-3000 T-Zellen in einer gemischten Leukozyten-Reaktion (*mixed leukocyte reaction*, MLR) stimulieren (BANCHEREAU AND STEINMAN, 1998).

2.1.5 Die Reifung von dendritischen Zellen

Der Prozess der Reifung spielt die zentrale Rolle in der Biologie von dendritischen Zellen und führt zum Stadium der Zellreife. Es handelt sich dabei um einen terminalen Differenzierungsgrad der Zellen, der dem Zustand der Unreife gegenübergestellt wird. Bei dendritischen Zellen ist die Reifung abgegrenzt von dem reversiblen und kurz währenden Zustand der Zellaktivierung, die z. B. eine Induktion von Zytokinen bei Immunzellen beschreibt. Die unreife dendritische Zelle ist ein Phagozyt mit einer Wächterfunktion in den epithelialen Geweben (2.1.4). Dieser patrouilliert aber auch im nicht-entzündeten Zustand in den peripheren Organen, der Lymphe und den Lymphgeweben, um Selbstantigene und Proteine der Umgebung für die Induktion von Toleranz zu sammeln (HUANG ET AL., 2000). Umgekehrt kann aber auch die Verabreichung von Fremdantigen an unreife dendritische Zellen zu Toleranz führen (BONIFAZ ET AL., 2002). Die antigenspezifische Toleranz wird über Anergie (T-Zell-Inaktivität) und regulatorische T-Zellen (T_{Reg}) vermittelt und beinhaltet das Ausbleiben von Effektor- und Gedächtnis-Zellen.

Der Prozess der Reifung wird initiiert durch Entzündung und Infektion von Geweben und ist gekennzeichnet von Veränderungen der Zellmorphologie, des Phänotyps und der funktionellen Kapazität der dendritischen Zelle. Charakteristisch für das Reifestadium ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Dieser wird u. a. bei der Rezeptorbindung durch TNF- α und IL-1 β , aber auch durch CD40- und TLR-Liganden wie LPS induziert. Nach einem Kontakt und der Aufnahme von Fremdantigen und bei inflammatorischen Signalen wandert die dendritische Zelle über die Lymphbahnen zu den regionalen Lymphknoten und über das Blut zu den peripheren Lymphorganen. Dabei bildet sie charakteristische, astartige Zytoplasma-Protrusionen (*veils*) aus, die sich deutlich von den langen, dünnen Ausläufern der unreifen dendritischen Zellen unterscheiden. Sie kann in diesem Differenzierungsstadium nur noch über *clathrin-coated-vesicles* eingeschränkt Endozytose betreiben, verstärkt aber die Expression von kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD86, B7-DC, ICOS-L), Mitgliedern der TNF-Familie (4-1BBL, OX40L, CD70) und der Chemokinrezeptoren CCR5 und CCR7 (STEINMAN, 2003). Für MHC-II-Produkte ist eine Verstärkung der Expression von bis zu 20-fach, für CD86 von bis zu 100-fach beschrieben. Vor allen Dingen zeichnet sich eine reife dendritische Zelle durch die Oberflächenexpression

des Moleküls CD83 aus. Außerdem besitzt sie eine hohe Kapazität, Antigen zu präsentieren und naive T-Zellen zu Effektorzellen differenzieren zu lassen und diese zu expandieren.

2.1.6 Priming, Proliferation und Polarisierung von naiven T-Zellen

Vom Thymus gelangen T-Zellen in den Blutkreislauf, werden zu den peripheren Lymphorganen transportiert und patrouillieren durch das Lymphgewebe (JANEWAY ET AL., 2001). Treffen sie dabei nicht auf das für ihren TCR passende Antigen, so können sie über das Blut andere periphere Lymphorgane erreichen. Erst wenn diese naiven T-Zellen Kontakt mit ihrem Antigen haben (*priming*), differenzieren sie zu T-Effektorzellen. Die beiden Signale Peptid:MHC-Erkennung und Kostimulation aktivieren T-Zellen, indem sie die Freisetzung des Zytokins IL-2 und gleichzeitig die Expression des hochaffinen IL-2-Rezeptors induzieren. Das Zytokin kann in autokriner und parakriner Weise an seinen Rezeptor binden (LANZAVECCHIA UND SALLUSTO, 2001). Als Folge davon tritt die T-Zelle in den Zellzyklus ein und proliferiert. Bietet jedoch eine unreife dendritische Zelle, ein nicht aktivierter Makrophage oder eine B-Zelle neben Antigenpräsentation keine Kostimulation, bleibt die IL-2 Synthese in der T-Zelle aus. Dieser Zustand der T-Zell-Inaktivität (Anergie) bildet in der Peripherie zusammen mit der Selektion von T-Zellen die Toleranz-Mechanismen gegenüber körpereigenem Antigen und gegenüber Antigen zwar fremder, aber nicht gefährlicher Mikroorganismen aus.

Sofern das Antigenpeptid von einem MHC-I-Molekül präsentiert wird, was bei zytosolischen, viralen und kreuzpräsentierten Peptiden auf dendritischen Zellen der Fall ist, wird die Entstehung von zytotoxischen T-Effektorzellen ($CD8^+$) gefördert. Wird jedoch das Antigen auf ein MHC-II-Molekül geladen und von einer reifen dendritischen Zelle präsentiert, wird die Bildung von Effektorzellen des T-Helfer- (T_H) Typs favorisiert. Nach dem instruktiven Modell generiert das Zytokin IL-12, dessen potentester Produzent die dendritische Zelle ist, eine T_H1 -Zelle, das Zytokin IL-4 eine T_H2 -Zelle (MURPHY UND REINER, 2002). Zur effektiven Stimulation von T_H -Zellen ist die Präsenz von drei Signalen Voraussetzung. In der immunologischen Synapse (MONKS ET AL., 1998) zwischen der dendritischen Zelle und der T_H -Zelle binden den Komplex Peptid:MHC-II (Signal 1) und B7-Moleküle (Signal 2) an ihre Liganden TCR und CD28. Das dritte, direkt polarisierende Signal ist PRR-vermittelt. Im Falle der

Bindung von PAMP aus Bakterien, Viren und Pilzen besteht es aus dem Zytokin IL-12 und induziert eine T_H1 -Zelle (KAPSENBERG, 2003). Neueste Daten zeigen, dass für die T_H1 -Richtung neben IL-12 selbst auch die Stärke des TCR-Signals, die Zytokine IL-27, IL-23, IL-18 und die durch IFN- $\alpha/\beta/\gamma$ verstärkte Expression des T-Box-Transkriptionsfaktors T-bet entscheidende Einflüsse haben (TRINCHIERI, 2003).

Bisher sind nur wenige T_H2 -polarisierende Signale 3 beschrieben. Das Glykoprotein ES-62 des Nematoden *Acanthocheilonema viteae*, das Eistadium von *Schistosoma mansoni* und die Gewebefaktoren Histamin, PGE₂ und TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*) induzieren in reifen dendritischen Zellen den CC-Chemokin Ligand 2 (CCL2). Für die T_H2 -Richtung sind außer der IL-4-vermittelten Induktion des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors GATA3 auch CD40 Rezeptor-Ligand Interaktion entscheidend beteiligt (KAPSENBERG, 2003). Eine unreife dendritische Zelle mit geringer Expression von CD80/86 kann in naiven T-Zellen bei Präsenz von IL-10 und TGF- β (Signal 3) eine regulatorische T-Zelle (T_{Reg}) induzieren. T_H1 -Zellen sezernieren IFN- γ und TNF- β , T_H2 -Zellen produzieren IL-4, IL-5 und IL-13. Das Zytokinprofil von T_{Reg} -Zellen ist charakterisiert durch IL-10 und TGF- β .

2.1.7 Aktivierung von Gedächtnis-, NK- und CD1-spezifischen T-Zellen

Gedächtniszellen haben die Fähigkeit, sich nach erneutem Antigenkontakt schnell teilen und effektiv auf Erreger reagieren zu können. Neben B-Gedächtniszellen, die kurzfristig bereits mit Antikörpern der späten Isotypen IgG, IgA und IgE antworten können, existieren MHC-I-induzierte CD8⁺T-Gedächtniszellen und CD4⁺T-Gedächtniszellen, denen Peptide auf MHC-II-Molekülen präsentiert werden. Bei einer geringen auf die T-Zelle wirkenden Signalstärke werden wenige Moleküle von Peptid:MHC-Komplexen und B7 von APC gezeigt. Sind die APC-T-Zell-Interaktionen außerdem nur von kurzer Dauer, werden aus dem Pool naiver T-Zellen zentrale CD4⁺ und CD8⁺T-Gedächtnis-Zellen (T_{CM}) gebildet (LANZAVECCHIA UND SALLUSTO, 2002). Sie können über die Expression von CCR7 zu den peripheren Lymphorganen patrouillieren und in diesem Zustand als T_{CM} durch T-Zell-Fitness für mehrere Jahre überleben. Als T-Zell-Fitness wird die Expression des anti-apoptotischen Moleküls BCL-X_L und des Rezeptors für IL-15 bezeichnet. Nach einer zweiten Stimulation mit Antigen, IL-7

und IL-15 proliferieren T_{CM}-Zellen, erwerben schnell Effektor-Funktion und können *homing* in die peripheren Gewebe zeigen (SALLUSTO ET AL., 1999).

Dendritische Zellen können auch direkt, ohne T-Zell-Hilfe naive B-Zellen aktivieren und Proliferation und Isotypenwechsel induzieren (WYKES ET AL., 2000; LITINSKIY ET AL., 2002). Außerdem differenzieren und expandieren sie mit den NK-Zellen (GEROSA ET AL., 2002) und über CD1 auch mit den NKT-Zellen (VINCENT ET AL., 2002), Lymphozytenpopulationen des angeborenen Immunsystems. Gleichzeitig können dendritische Zellen selbst von NK- (PICCIOLI ET AL., 2002), NKT- (VINCENT ET AL., 2002) und γ/δ -T-Zellen (LESLIE ET AL., 2002) über noch ungeklärte Mechanismen zur Reife gebracht werden. Natürliche Killer-T-Zellen und γ/δ -T-Zellen exprimieren beide ein NK-spezifisches Antigen, das NKG2D-Molekül, und besitzen einen TCR mit eingeschränkter Diversität. Bei NK-Zellen besteht er aus einer α - und einer β -Kette, die spezifisch von CD1d präsentierte glykosilierte Lipidantigene erkennen, worauf die Zellen schnell mit IFN- γ und IL-4 antworten können (FRITSCH, 2004). Bei γ/δ -T-Zellen werden u. a. Glykolipide im Kontext mit CD1b präsentiert, und die Zellen können Zytokine freisetzen und zytotoxisch wirken.

2.2 Aufbau von Haut und Epidermis

Der Haut als flächenmäßig größtes Organ des menschlichen Organismus kommt eine wichtige Funktion bei der Abwehr pathogener Mikroorganismen zu. In der Oberhaut (Epidermis), einem Plattenepithel, findet ein Verhornungsprozess statt, in dessen Folge Kerneozyten eine Hornschicht als Barriere zur Außenwelt ausbilden. Kerneozyten sind terminal differenzierte Keratinozyten. Sie bilden das Stratum corneum aus 10-20 Zellschichten in Säulenarchitektur aus abgeplatteten und erstarrten toten Zellen in Tetrakaidekaeder-Form aus (FRITSCH, 2004). Im darunter anschließenden Stratum granulosum verlieren die Keratinozyten im Differenzierungsprozess ihre Zellkerne und Organellen. Die horizontale Ausrichtung der Zellachse erfolgt im Stratum spinosum, im Stratum basale werden Keratinozyten aus Stammzellen gebildet. Zur darunter liegenden, bindegewebigen Dermis ist die Epidermis abgegrenzt durch eine Basallamina. Diese bildet Ausstülpungen (Retezapfen) in die Dermis. Die Keratinozyten haben in den oberen, epidermalen Zellschichten untereinander Zellverbindungen über Desmosomen und Adhärenzkontakte mit Cadherinen. Mit der Lamina

lucida der Basalmembran sind die Keratinozyten über Hemidesmosomen (halbe Haftplatten) verankert. Die LC liegen in der Epidermis auf der Basalzellschicht (suprabasal). Sie bilden mit den unmittelbar benachbarten und über Dendriten-Ausläufer im Interzellularraum auch mit weiter entfernten Keratinozyten Kontakte aus. Der funktionelle LC-Keratinozyten-Kontakt wird durch die homophile, Ca^{2+} -abhängige Bindung des Moleküls E-Cadherin gebildet (TANG ET AL., 1993). In der Epidermis kommen neben LC und Keratinozyten noch Merkelzellen (neuroendokrin, Mechanorezeptoren), die Pigment-produzierenden Melanozyten und wenige CLA^+ Gedächtnis-Zellen vor. Es konnte in der humanen Brusthaut ein Verhältnis von einer LC auf 53 andere epidermale Zellen ermittelt werden (BAUER ET AL., 2001). Diese Laserscanning-Studien bezogen bei der Ermittlung der LC-Zahl erstmals die variierende Dicke der Epidermis mit ein. Biopsien aus verschiedenen Hautbereichen ergaben einen Anteil von 1,86 % LC in den epidermalen Zellen. Dieses konstante Verhältnis unterstützt die Hypothese der Existenz einer „epidermalen LC-Einheit“ (WOLFF, 1972), in der eine LC die Immunüberwachung für eine konstante Anzahl anderer epidermaler Zellen in dieser Einheit übernimmt.

2.3 Immunologische Vorgänge in der Haut

Neben ihrer Funktion als passive, physikalische Barriere zwischen Körper und Umgebung besitzt die Haut verschiedene aktive Verteidigungsmechanismen gegen pathogene Erreger. Zusammen mit anderen epithelialen Zellgrenzgeweben im Gastro-Intestinaltrakt und im respiratorischen System ist die Haut Angriffen pathogener Organismen direkt expositioniert. Die Haut ist befähigt, schnell und effektiv auf jegliche Angriffe parasitischer Würmer und Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze und Protozoen zu reagieren. Dabei wird durch die kutane Immunüberwachung die Homöostase in der Haut aufrechterhalten. Die Mechanismen der humoralen und der zellvermittelten Immunantwort dienen der Abwehr von Infektionen, der Kontrolle von kommensalen Mikroorganismen und der Erkennung von kutanen Tumoren. Genetisch bedingte oder erworbene Ausfälle und Überfunktionen der Immun-Überwachung können sich auch in vielfältiger Weise durch entzündliche Hauterkrankungen äußern. Dazu zählen u. a. Psoriasis (Schuppenflechte), atopische Dermatitis und Kontakt-Hypersensibilität, Vitiligo, Lichen planus und Alopecia areata.

Die Haut verfügt bereits über effiziente Abwehrmechanismen in Form des angeborenen Immunsystems. Dieses kann Strukturen auf Pathogenen (PAMP) und Zerstörungen von Gewebe erkennen. Zelluläre Vertreter sind die Phagozyten, die Zytokin-freisetzenden Mastzellen, die baso- und eosinophilen Granulozyten und die NK-Zellen. In der Epidermis haben anti-mikrobielle Proteine wie β -Defensine, Cathelicidine und Lysozym, in der Dermis das Komplementsystem und Interferone wichtige Schutzfunktionen (YANG ET AL., 2004).

2.4 LC, die zuerst beschriebenen dendritischen Zellen bleiben rätselhaft

LC sind unreife dendritische Zellen in der Epidermis, die ekto-ATPase, E-Cadherin und MHC-II-Moleküle exprimieren. Als einzige Zellen besitzen sie Birbeck Granulae (BG) und tragen den mit dieser Struktur assoziierten Rezeptor Langerin. Außer in der Epidermis konnten LC in der Ultrastruktur über die Organelle BG in der Dermis, im Thymus, der Mukosa, Gefäßwänden, in respiratorischen Geweben und in Lymphknoten nachgewiesen werden (ROMANI ET AL., 2003). Diese BG kommen im Zytoplasma oft als Stapel vor, haben eine trilaminare Struktur, Tennisschläger- oder Stabform. Obwohl ältere Untersuchungen bereits belegen, dass BG in Verbindung zum Extrazellularraum stehen und eine endozytotische Funktion nahe legen (HASHIMOTO, 1970), ist ihre Funktion bis heute erst andeutungsweise aufgeklärt. Vor kurzem wurde mit dem Langerin-Molekül der Antigenrezeptor von LC entdeckt (VALLADEAU ET AL., 2000). Dieses Lektin vom C-Typ wird von der ruhenden LC sowohl auf der Zelloberfläche als auch innerhalb der BG exprimiert. Langerin wird nach Kreuzbindung durch einen spezifischen Ak in die Zelle internalisiert. Dieser Befund weist auf eine Funktion als Endozytoserezeptor für Antigene und Pathogene hin (FIGDOR ET AL., 2002). Aber auch ein Transfer der Organelle zwischen *recycling* Endosomen und Zellmembran wird beschrieben (MCDERMOTT ET AL., 2004). Langerin hat auf dermalen dendritischen Zellen seine Entsprechung im zu 70 % sequenzähnlichen DC-SIGN Molekül, einem Rezeptor für HIV-1. Da Langerin intrazellulär nicht mit MHC-II-Molekülen kolokalisiert (VALLADEAU ET AL., 2000), ist eine Beteiligung bei der exogenen Kreuzpräsentation eher wahrscheinlich (HEATH ET AL., 2001). LC können über Phagozytose Organellen wie pigmenthaltige Melanosomen, aber auch ganze Fremd-Organismen wie Bakterien und parasitäre Leishmanien und auch Dengue- und Encephalitis-Viren aufnehmen (ROMANI ET AL., 2003).

Die Zunahme der Kapazität von dendritischen Zellen, T-Zellen zu stimulieren, verläuft parallel zur Abnahme von Phagozytose- und Prozessierungs-Potenzial und wurde zuerst bei LC beschrieben (SCHULER UND STEINMAN, 1985; ROMANI ET AL., 1989). Trotzdem ist die Bedeutung der LC bei der Einleitung von Immunität und Toleranzreaktionen nicht im Detail geklärt. Die für die Untersuchung von Immunität und Toleranzinduktion notwendigen LC, die LC *in vivo* und im *steady state* entsprechen sollten, können durch die bisher etablierten Anreicherungsverfahren nicht gewonnen werden. Neue Untersuchungen stellen das Differenzierungsmodell von absolut unreifen Phagozyten und terminal reifen APC in Zweifel. So konnte gezeigt werden, dass LC im *steady state* in den Lymphknoten bereits Reifungsmarker exprimieren (GEISSMAN ET AL., 2002). Auf der anderen Seite erwerben sie aber in chronisch entzündeten Lymphknoten keinen reifen Phänotyp (STOIZNER ET AL., 2003).

Epidermale LC leiten sich von hämatopoetischen Zellen aus dem Knochenmark ab. Trotz der Expression des lymphoiden CD8 α -Markers bei murinen LC (MERAD ET AL., 2000) und der Differenzierung von LC aus lymphoiden Vorläufern (ANJUÈRE ET AL., 2000) wurde die Zugehörigkeit zur myeloiden Linie postuliert. LC weisen eine Lebensdauer von bis zu vier Monaten auf und in der Epidermis teilen sich nur wenige Zellen. In der nicht-entzündeten Haut findet ein geringer *turnover* statt und die sich teilenden LC stammen aus einem dermalen oder epidermalen Vorläufer-Pool. Erst beim Auftreten von Entzündungen werden Monozyten oder andere Vorläufer-Zellen aus dem Blut in die Epidermis rekrutiert (MERAD ET AL., 2002). *In vivo*-Untersuchungen der Zugehörigkeit zur lymphoiden oder myeloiden Linie zeigten, dass *knock-out*-Mäuse mit den ausgeschalteten lymphoid-spezifischen Transkriptionsfaktoren RelB, Ikaros und Notch-1 normale LC besaßen (ROMANI ET AL., 2003). Anders als diese Transkriptionsfaktoren scheint TGF- β 1 für die Entwicklung von LC essenziell zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass Mäusen mit ausgeschaltetem TGF- β 1-Gen selektiv LC in der Epidermis fehlten (BORKOWSKI ET AL., 1996). Allerdings geben diese Untersuchungen keinen Hinweis auf die Abstammung der Zellen, da TGF- β 1^{-/-}-Mäuse sowohl funktionelle Vorläufer-Zellen von LC als auch andere Zellen der myeloiden Linie besaßen (BORKOWSKI ET AL., 1997; BOIVIN ET AL., 1995). Auf eine myeloide Abstammung deuten Untersuchungen der Expression des myeloid-spezifischen Transkriptionsfaktors PU.1 hin, da sich PU.1-transfizierte Vorläufer-Zellen zu Zellen mit LC-Phänotyp entwickelten (IWAMA ET AL., 2002).

2.5 Auswanderung aus der Epidermis zu den regionalen Lymphknoten

Nach Antigenkontakt werden LC mit Wächterfunktion mobilisiert, emigrieren aus der Epidermis und wandern zu den regionalen Lymphknoten. Beteiligt an der Mobilisierung ist die Regulation der Adhäsionsmoleküle LFA-1, ICAM-1, Integrin α_6 , CD44 und E-Cadherin. Eingeleitet wird dieser Prozess durch die Freisetzung epidermaler Zytokine (WANG ET AL., 1999). Wie auch bei Sensibilisierungsreaktionen wird früh das Zytokin IL-18 sezerniert, das die Expression der folgenden Zytokine verstärkt. Dabei wirken IL-1 α , das von Keratinozyten exprimiert wird, und IL-1 β , das hauptsächlich von LC freigesetzt wird (HEUFLER ET AL., 1992) autokrin und parakrin über IL-1RI. Keratinozyten produzieren außerdem TNF- α , das bei dendritischen Zellen den Umbau des Aktin-Zytoskeletts einleiten kann (WINZLER ET AL., 1997).

Die Adhäsion der LC an die Keratinozyten wird über die Herunter-Regulation des E-Cadherin-Moleküls durch IL-1 α , IL-1 β und TNF- α gelöst (TANG ET AL., 1993). Bei Mäusen verlassen LC nach intradermaler Applikation von IL-1 β und TNF- α die Epidermis und können in den drainierenden Lymphknoten wiedergefunden werden (CUMBERBATCH ET AL., 1997). Bemerkenswerterweise wird bei Administration von Kontaktallergenen parallel zu diesen inflammatorischen Zytokinen auch IL-10 gefunden, das antagonistisch gegenüber IL-1 β und TNF- α wirkt (ENK ET AL., 1992). Den Weg zum Lymphknoten finden LC unter dem Einfluss der Chemokine MIP (*macrophage inflammatory protein*)-1 α , MIP-1 β , MIP-5, MCP (*monocyte chemotactic protein*) -1 bis -4, RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*), MDC (*macrophage-derived chemokine*) und SDF-1 (*stromal cell-derived factor*) (WANG ET AL., 1999). Von den Chemokinrezeptoren ist CCR7 in reifenden dendritischen Zellen hochreguliert. Wird der Ligand SLC (*secondary lymphoid tissue chemokine*) von Endothelzellen freigesetzt, wandern LC in die afferenten Lymphgefäße. Von dort werden die mobilisierten LC zu den T-Zell-Arealen der Lymphknoten dirigiert. Dorthin werden LC von Zellen der HEV und von Stromazellen chemotaktisch über SLC gelenkt. Neben SLC-CCR7-Signalen können LC auch über den Liganden MIP-3 β , der von dendritischen Zellen in den T-Zell-Arealen produziert wird, dirigiert werden.

2.6 Das Modell der Immun-Überwachung in der Haut

Das Konzept der Immun-Überwachung in der Haut postuliert drei Stadien der T-Zell-Antwort (KUPPER UND FUHLBRIGGE, 2004). Das erste Stadium beinhaltet das *priming* naiver T-Zellen im lokalen Lymphknoten durch APC. Im zweiten Stadium werden patrouillierende T-Gedächtnis-Zellen aus den Gefäßen rekrutiert. Zentrale T-Gedächtnis-Zellen haben als dritter Teil der Überwachung in der Haut die Fähigkeit, Immunantworten an einem anderen Ort als der Umgebung, in der sie ihre Spezifität erhalten haben, zu verstärken. In der nicht-entzündeten Haut können die immunologisch relevanten Zellen in den verschiedenen kutanen Kompartimenten lokalisiert werden: Keratinozyten und LC in der Epidermis; dermale dendritische Zellen, Mastzellen, Bindegewebs-Fibroblasten und wenige T-Gedächtnis-Zellen in der Dermis; naive T-Zellen, Monozyten und Granulozyten in den postkapillären Venolen. Die T-Gedächtnis-Zellen patrouillieren in geringem Umfang auch unter normalen Bedingungen in der nicht-entzündeten Haut von den Venolen in die Haut. Im Unterschied zu den anderen Lymphozyten und Phagozyten in den Gefäßen exprimieren sie bereits verschiedene Adhäsionsmoleküle, die eine solche Einwanderung antigen-spezifischer T-Zellen ermöglichen (KUPPER UND FUHLBRIGGE, 2004).

Bei der primären Immun-Überwachung werden LC und dermale dendritische Zellen durch inflammatorische Zytokine oder TLR-Signale aktiviert. Am Ort der Gewebeerletzung oder der Invasion des Pathogens können diese Zellen nun verstärkt Fremdanigen aufnehmen und wandern über afferente Lymphbahnen zu den regionalen Lymphknoten. Dort angekommen, sind sie zu APC ausgereift und können zirkulierende naive T-Zellen zu Effektor-T-Zellen differenzieren lassen und in die Proliferation bringen. Hierbei interagieren Moleküle und Zellen des angeborenen Immunsystems mit denen des adaptiven Immunsystems. Gerade bei den dendritischen Zellen wird die Verzahnung beider Systeme deutlich. Sie exprimieren im unreifen Phagozyten-Stadium TLR und sezernieren nach Erregerkontakt inflammatorische Zytokine für T- und B-Zellen und sind selbst als reife APC Bestandteil der adaptiven Immunantwort.

Auf die Invasion von pathogenen Erregern oder Verletzungen des Epithels reagieren die Akteure des angeborenen Immunsystems unmittelbar. TLR und andere PRR auf LC und dermalen dendritischen Zellen erkennen gemeinsame Zellwandbestandteile oder andere

molekulare Strukturen (PAMP) bestimmter Erregerklassen. Derart aktiviert setzen diese Zellen ein nicht Antigen-, aber doch Erregerklassen-spezifisches Muster an anti-mikrobiellen Peptiden, Chemokinen und Zytokinen frei. Als Antwort auf verschiedene Liganden für TLR sezernieren aktivierte Keratinozyten NF- κ B-vermittelt hohe Spiegel von TNF- α und IL-1 α ; LC setzen IL-1 β frei. Mastzellen produzieren in der Dermis GM-CSF, IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 und TNF- α (MCCURDY ET AL., 2003). Zusammen mit Zytokinen, die von dermalen dendritischen Zellen und Fibroblasten hergestellt werden, induzieren diese Mediatoren auf den Endothelzellen der dermalen Gefäße die Expression von Adhäsionsmolekülen. Die Antigen-unspezifischen neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Monozyten und NK-Zellen können nun in den Venolen an E-Selektin, P-Selektin und ICAM-1 binden. Infolge dieser Adhäsions-Extravasations-Kaskade können sie zwischen den Endothelzellen in die Dermis eindringen.

Durch das *homing* von Effektor-T-Gedächtnis-Zellen ist auch der adaptive Teil des Immunsystems an der Haut-Überwachung beteiligt. Die in den postkapillären Venolen zirkulierenden T-Gedächtnis-Zellen exprimieren CD45RO und das kutane Lymphozyten-Antigen CLA. Diese Rekrutierung von T-Zellen (*homing*) in die Haut erfolgt bereits vor und parallel zum neuen *priming* naiver T-Zellen und ist Antigen-unabhängig. Dabei können T-Gedächtnis-Zellen in Abhängigkeit von den CC-Chemokin-Liganden CCL17, CCL22 und CCL27 auf Endothelzellen in die Dermis und Epidermis einwandern (sekundäre Immun-Überwachung). Dort treffen die T-Gedächtnis-Zellen auf dermale dendritische Zellen, LC und angelockte Makrophagen, die ebenfalls an der Beseitigung des Erregers beteiligt sind. Falls eine Effektor-T-Gedächtnis-Zelle den spezifischen TCR für ein präsentiertes Epitop des Erreger-Antigens auf der Zelloberfläche trägt, kann eine Proliferation und Effektorfunktion lokal im Epithel, ohne Migration von APC zum Lymphknoten und dortige Antigen-präsentation, ausgelöst werden. Die Mehrzahl der T-Zellen, die keinen Kontakt mit dem von ihnen erkennbaren Antigen haben, kehrt über die Lymphgefäße in die Zirkulation zurück. Obwohl das *homing* der Effektor-T-Gedächtnis-Zellen verstärkt als Reaktion auf das Eindringen von Erregern erfolgt, scheint dieser Vorgang auch konstitutiv im nicht-entzündeten Gewebe aufzutreten (JANSSEN ET AL., 1994).

Eine systemische Kontrolle in anderen Geweben und Organen wie Lunge, Gastrointestinaltrakt und Muskel bildet die tertiäre Immun-Überwachung. Dabei werden in den Lymphknoten der Haut neben lokal fungierenden Effektor-T-Gedächtnis-Zellen auch zentrale T-Gedächtnis-Zellen (SALLUSTO ET AL., 1999) gebildet. Diese werden durch die Expression von L-Selektin und CCR7 befähigt, zu den Lymphknoten anderer Gewebe im ganzen Körper zu gelangen und dort auf regionale dendritische Zellen zu treffen, die dasselbe Antigen zeigen. Dadurch verstärkt sich die adaptive Immunantwort und setzt auch schneller ein.

2.7 Generierung von LC aus Monozyten und CD34⁺Vorläufer-Zellen

In der Grundlagenforschung, bei der Tumorthherapie und bei der Induktion von Toleranz gegen Organ-Transplantate besteht ein Bedarf an unreifen dendritischen Zellen. Wegen ihrer geringen Anteile im Blut wurden alternativ zur Isolierung Methoden entwickelt, dendritische Zellen in der Zellkultur aus Vorläufer-Zellen zu generieren. Unter dem Einfluss der Zytokine GM-CSF und TNF- α differenzieren CD34⁺Stammzellen aus humanem Nabelschnurblut zu dendritischen Zellen (CAUX ET AL., 1996). Die Zugabe von GM-CSF und IL-4 oder IL-13 lässt auch Blut-Monozyten innerhalb von sechs Tagen Zellkultur zu unreifen dendritischen Zellen (*monocyte-derived dendritic cell*, MoDC) werden (SALLUSTO UND LANZAVECCHIA, 1994; ROMANI ET AL., 1994).

Auch LC können in beliebiger Anzahl durch Generierung mit Zytokinen gewonnen werden. Für den LC-Phänotyp werden CD34⁺Stammzellen mit GM-CSF und TNF- α (CAUX ET AL., 1992), Monozyten mit GM-CSF und IL-4 oder IL-15 und TGF- β kultiviert (GEISSMANN ET AL., 1998; MOHAMADZADEH ET AL., 2001). TGF- β wird in der Epidermis von Keratinozyten sezerniert und induziert in der Zellkultur sowohl in CD34⁺Stammzellen als auch in Monozyten die Expression von BG (STROBL ET AL., 1996; GEISSMANN ET AL., 1998). Da jedoch nur ein Teil der generierten Zellen BG und Langerin exprimiert, haben Untersuchungen mit diesen „LC-ähnlichen Zellen“ nur eingeschränkte Aussagekraft.

Direkt aus der Haut können murine und humane LC durch Isolierung oder in der Haut-Organkultur (ROMANI ET AL., 1989) gewonnen werden. Die Organkultur von Haut repräsentiert eine entzündliche Situation. Nach drei bis fünf Tagen sind Zellen emigriert, die

in der Größenzunahme, der Expression von Klasse-II-Molekülen und in der Antwort in der MLR bereits reife dendritische Zellen darstellen (LARSEN ET AL., 1990).

2.8 Präsentation von Lipid-Antigen über CD1-Moleküle

Seit kurzer Zeit ist bekannt, dass eine Gruppe von T-Zellen auch andere Antigene als Peptide, die auf MHC-I und MHC-II Molekülen präsentiert werden, erkennen kann (PORCELLI UND MODLIN, 1999). Diese CD1-abhängigen T-Zellen können im Anfangsstadium einer Infektion auf Lipid-Antigene reagieren. Über CD1-Moleküle, die im Gegensatz zu MHC-Molekülen nicht polymorph sind, zeigen Thymozyten, B-Zellen und myeloide dendritische Zellen Selbst- und bakterielle Lipide. Alle CD1-Moleküle werden als Transmembranproteine auch auf der Zelloberfläche exprimiert und sind mit einer β 2-Mikroglobulin-Kette kovalent verbunden. Die erste und die zweite Domäne der schweren α -Kette bilden eine enge, tiefe Bindungsgrube für hydrophobe Wechselwirkungen. Dabei werden über die Isoformen CD1a, CD1b und CD1c (Gruppe 1) Selbst- und mikrobielle Lipid-Antigene an T_H -, T_Z - und $CD4^+$ / $CD8^+$ -T-Zellen präsentiert (MOODY UND PORCELLI, 2003). Es scheint so, dass CD1-abhängige T-Zellen über die Länge der Fettsäureketten mikrobielle von Säuger-Glykolipiden strukturell unterscheiden können (MOODY ET AL., 2002). Über Gruppe 2-Isoformen von CD1d hingegen wird z. B. das ungewöhnliche Glykolipid α -Galactosylceramid an NKT-Zellen präsentiert. CD1e schließlich, das ebenfalls auf dendritischen Zellen gefunden werden kann, repräsentiert die Gruppe 3 (ANGENIEUX ET AL., 2000). CD1-Moleküle sind in der Zelle in verschiedenen Kompartimenten verteilt. Während CD1a auf der ruhenden dendritischen Zelle ausschließlich auf der Zelloberfläche vorkommt, können CD1b und CD1c mit Präferenz im Lysosomen gefunden werden.

In der Epidermis exprimieren LC exklusiv hohe Level von CD1a (FITHIAN ET AL., 1981). Neue Befunde über die Funktion von CD1a zeigen, dass LC-ähnliche dendritische Zellen im direkten Vergleich mit MoDC über CD1a effizienter Antigene von *Mycobacterium leprae* an CD1a-abhängige T-Zellen präsentieren können (HUNGER ET AL., 2004). LC zeigen auch das im endozytotischen System vorkommende CD1c-Molekül, während CD1b eher schwach exprimiert wird (CAUX ET AL., 1992). CD1d kommt in der Haut hauptsächlich auf dermalen dendritischen Zellen vor.

2.9 Magnetische Zell-Sortierung (*magnetic cell sorting*, MACS)

Die MACS-Technologie ist besonders geeignet, um seltene Zellpopulationen aus Blut oder Geweben zu isolieren. Sie basiert auf der kovalenten Koppelung von paramagnetischen Nanopartikeln (Mikrobeads) an antigenspezifische mAk und einer Zurückhaltung von Mikrobeads-gebundenen Zellen in einem starken magnetischen Feld (MILTENYI UND PFLÜGER, 1992). Die Mikrobeads bestehen bei der MACS-Technik aus kopräzipitiertem Eisenoxid (Fe_2O_3) und dem Polysaccharid Dextran. An einen solchen Mikrobead-Komplex sind im Durchschnitt 10-200 Antikörper gebunden (KANTOR ET AL., 1997). Alternativ zu der Positiv-Isolierung können über eine Depletion auch kontaminierende Zellpopulationen ohne die funktionelle Bindung eines Antigens auf der interessierenden Population entfernt werden. Zellen weisen selbst einen nur sehr schwachen Diamagnetismus auf, der durch das enthaltene Wasser verursacht wird. Wegen dieses schwachen magnetischen Hintergrundes können paramagnetische Mikrobeads bei der Isolierung eingesetzt werden. Mit einem Durchmesser von 15-100 nm bleiben die kleinen Partikel kolloidal, also aufgrund der zufälligen Zusammenstöße der Brown'schen Molekular-Bewegung in Dispersion (KANTOR ET AL., 1997). Bei der Isolierung gewährleistet die ferromagnetische Matrix einer Trennsäule, die direkt einem magnetischen Feld exponiert ist (Barium-Neodym-Magnet), eine konstante Passagegeschwindigkeit der Zellen. Zwischen den Polen des permanenten Magnets mit 0,5-1 Tesla können auf die Umgebung der in der Matrix dicht gepackten Stahlkügelchen (50-100 μm Durchmesser und 100-200 μm Abstand) sehr hohe magnetische Induktionskräfte ausgeübt werden. Im Vergleich zu anderen Methoden können durch MACS Zellen, die in sehr geringen Anteilen vorkommen, steril, vergleichsweise mit wenig Manipulation und mit geringem apparativem und zeitlichem Aufwand isoliert werden.

2.10 Aufgabenstellung

LC sind in der Epidermis-Schicht der Haut die Initiatoren von spezifischen Zell- und Antikörperantworten des Immunsystems. Im Mausmodell liegen über die Aufnahme und den Transport von bakteriellen und viralen Antigenen und Kontaktallergenen umfangreiche Daten vor (ROMANI ET AL., 2003). Über die Fähigkeit der LC, in ihrer epidermalen Umgebung, also vor der Migration in lymphatische Gewebe im noch unreifen Zustand Immunantworten zu induzieren, ist wenig bekannt. Im humanen System werden Untersuchungen fast ausschließlich mit anderen dendritischen Zellen durchgeführt. Diese bestehen wiederum aus zahlreichen Subpopulationen mit spezifischen Aufgaben, unterschiedlichen Phänotypen und funktionellen Eigenschaften (LIU ET AL., 2001). Primäre Zielsetzung der vorliegenden Arbeit sollte es deshalb sein zu prüfen, ob sich stimulierte epidermale LC von ähnlichen dendritischen Zellen aus dem Blut unterscheiden.

Dafür sollte zuerst eine Methode etabliert werden, mit CD1a- und CD1c-Mikrobeads LC aus der humanen Haut in hoher Reinheit und Anzahl zu isolieren. Da direkt-gekoppelte Mikrobeads eingesetzt werden konnten, schien eine Verbesserung der LC-Isolierung gegenüber vorherigen Untersuchungen (NILSSON ET AL., 1987; HANAU ET AL., 1988; SIMON ET AL., 1995) erreichbar. Für Stimulationsexperimente war es notwendig, die Präparation durch möglichst geringe Manipulation der LC bei der Anreicherung zu optimieren. Um einen nicht-aktivierten Status zu überprüfen, sollten Untersuchungen der Oberflächenmoleküle, der Ultrastruktur der Zelle, sowie Zytokinmessungen und funktionelle T-Zell-Tests durchgeführt werden.

In weiterführenden Experimenten sollten diese isolierten LC mit LC-ähnlichen MoLC, die aus Monozyten generiert werden können (GEISSMANN ET AL., 1998), verglichen werden. Da bislang Daten fehlen, ob LC in Entzündungssituationen eher inflammatorische oder suppressive T-Zell-Antworten induzieren, sollte die Freisetzung der Zytokine IL-12 und IL-10 gemessen werden. Als *in vitro*-Modell für die Aktivierung von LC in einer entzündlichen Situation wurden das kostimulatorische T-Zell-Signal der Ligation von CD40 und das TLR-bindende LPS gram-negativer Bakterien gewählt. Zusätzlich sollten erstmals Studien mit den TLR-Liganden Peptidoglykan und Flagellin unternommen werden. Des Weiteren

sollten die funktionelle Differenzierung von stimulierten LC und MoLC nach TLR-Ligation und die T-Zell-polarisierende Potenz der Zellen verglichen werden.

Den letzten Teil dieser Arbeit sollten die ersten Mikroarray-Expressionsanalysen von stimulierten LC umfassen. Dabei sollte vorrangig untersucht werden, welche Zytokin-, Phänotyp- und Apoptose-assoziierte Gene in stimulierten LC differentiell exprimiert werden.