

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 MACS-Isolierung mit CD1a/CD1c und phänotypische/funktionelle Charakterisierung von LC aus der humanen Haut

#### 4.1.1 Ein Antikörper gegen CD1a separiert hochreine HLA-DR<sup>+</sup> Zellen aus der Gesamtpopulation epidermaler Zellen

In der Epidermis wird das CD1a-Antigen von Langerhans-Zellen (LC) exklusiv exprimiert (FITHIAN ET AL., 1981). Aus diesem Grund sollten in den vorliegenden Untersuchungen LC über einen Anti-CD1a und die MACS-Technologie isoliert werden. Der CD1a-Antikörper ist direkt an sehr kleine (15 nm), paramagnetische Mikrobeads gekoppelt. Frühere Versuche, mit einem CD1a-mAk und magnetischen Beads humane LC anzureichern, hatten gravierende Nachteile. Große Beads (2-5 µm, HANAU ET AL., 1988) manipulieren die isolierten Zellen in der Zellkultur und bei funktionellen Experimenten. Erste Versuche mit Mikrobeads, die über Streptavidin indirekt an einen biotinylierten Anti-CD1a gebunden worden waren (SIMON ET AL., 1995), zeigten mit 45-88 % CD1a<sup>+</sup>Zellen hohe Kontamination. Die Reinheit der LC und die Effizienz der Anreicherungsmethode sollten in Experimenten dieser Arbeit mit einem erstmalig verfügbaren, direkt Bead-konjugierten CD1a-Ak optimiert werden.

Mit den Zellen der ersten Spender wurde der mAk Anti-CD1a (Klon HI149) austitriert und es wurde für hohe Reinheit der Zellen eine optimale Verdünnung von 1:300 ermittelt. Bei dieser Ak-Konzentration im MACS-Puffer konnten nicht alle theoretisch in der Epidermis vorhandenen LC gewonnen werden (**Tab. III**). LC sind in der Brusthaut mit einem Anteil von 1,86 % in der Population der epidermalen Zellen vertreten (BAUER ET AL., 2001). Mit CD1a-MACS wurden 0,4 % aller epidermalen Zellen isoliert (Ausbeute). Diese angereicherten Zellen exprimierten im Mittel zu 93 % das CD1a-Antigen (Reinheit). Bei höheren Ak-Konzentrationen wurden deutlich mehr Zellen isoliert. Diese exprimierten aber auch deutlich weniger HLA-DR. Die zusätzlich gewonnenen Zellen stellten Kontaminationen mit Keratinozyten dar, die kein HLA-DR im nicht-aktivierten Zustand exprimieren (DEZUTTER-DAMBUYANT ET AL., 1984). Der Anteil kontaminierender Keratinozyten konnte schließlich durch einen zusätzlichen Isolierungsschritt unter Verwendung einer zweiten Selektionssäule effizient entfernt werden.

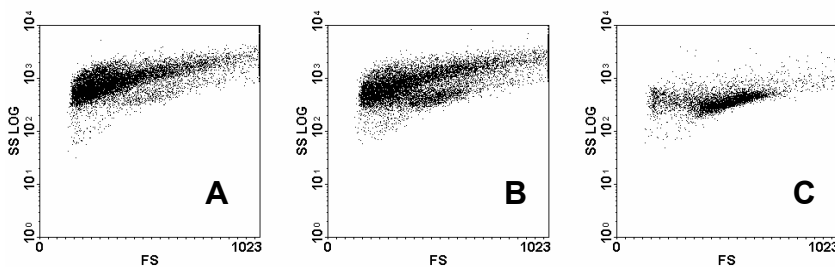
Die angereicherten Zellen hatten in Zellzahl- und Zellgrößen-Analyse eine durchschnittliche Größe von 11,3  $\mu\text{m}$ , und 93 % der Zellen waren in der Durchflusszytometrie doppelt positiv für CD1a und HLA-DR. Die CD1a-Expression wurde über die Markierung mit einem sekundären Antikörper-Fragment, Ziege Anti-Maus F(ab')<sub>2</sub>, der gegen den Isolierungs-Antikörper gerichtet war, ermittelt. Die CD1a-Zellsortierung mit wiederholtem Säulenauftrag erbrachte mit spenderabhängigen Abweichungen eine durchschnittliche Zellausbeute von  $1 \times 10^6$  CD1a<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> Zellen aus 25 g humaner Haut. Anfärbungen mit PI, das die permeable Membran von toten Zellen passiert und in die DNA interkaliert, zeigten, dass sowohl bei Einzel- und Doppelseparation 90 % aller isolierter Zellen lebendig waren. Der erhöhte Reinheitsgrad der Zellanreicherung, der durch den nachfolgenden zweiten Säulenlauf erzielt werden konnte, war jedoch begleitet von einem Zellverlust von 77 % der LC. Die MACS-Isolierung mit geringen Konzentrationen von CD1a-Mikrobeads und einem zweiten Säulenauftrag erbrachte wenige, aber hochreine und viable Zellen. Diese exprimierten CD1a und HLA-DR, es waren also LC.

**TABELLE III: Vergleich von Ausbeute und Reinheit der CD1a- und CD1c-isolierten LC.** Die Gesamtausbeute gibt den Anteil der isolierten Zellen von allen epidermalen Zellen an. Angeführt ist die CD1a-Expression in der Fraktion der isolierten Zellen mit CD1a- und CD1c-MACS. Über die Expression von CD1a wurde die Anzahl der LC pro 10 g Hautgewebe ermittelt. Die Zahlen geben Mittelwerte und Standardabweichung (SD) von zehn Haut-Präparationen wieder.

<u>Isolierung mit:</u>	<b>CD1a</b>		<b>CD1c</b>	
	<u>Mittel</u>	<u>SD</u>	<u>Mittel</u>	<u>SD</u>
Gesamtausbeute [%]	0,4	0,2	0,6	0,2
CD1a-Expression [%]	92,6	3,8	98,8	0,8
LC/10 g Haut	$4,0 \times 10^5$	$2,6 \times 10^5$	$6,3 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$

#### 4.1.2 Die CD1a-isolierten Zellen entsprechen phänotypisch humanen LC

In den Isolierungsexperimenten dieser Arbeit konnten humane epidermale LC zum ersten Mal über CD1a in hoher Reinheit angereichert werden. Mit diesen Zellen waren durchflusszytometrische Analysen von verschiedenen Oberflächenmolekülen auf LC im unreifen Stadium möglich. Die hoch angereicherten Zellen wurden routinemäßig nach der Sortierung mit dem Komplex aus sekundärem Antikörper-Fragment-Cy5 gegen den Isolierungs-mAk und einem direkt-markierten Anti-HLA-DR-PE doppelt gefärbt. Als jeweils dritte Färbung wurden verschiedene mAk-FITC gegen eine Reihe für dendritische Zellen funktionell relevanter Antigene eingesetzt. FACS-Analysen des Streulichts zeigten, dass sich im Vergleich mit CD1a-negativen Zellen und Zellen, die nur einmal über die Säule gegeben wurden, zweimal-positiv isolierte Zellen als weniger granulierte, diskrete Population identifizieren ließen (**Abb. 3**). Subpopulationen, wie sie bei *in vitro* generierten dendritischen Zellen und LC vorkommen (SALLUSTO UND LANZAVECCHIA, 1994; CAUX ET AL., 1992), konnten nicht ausgemacht werden.



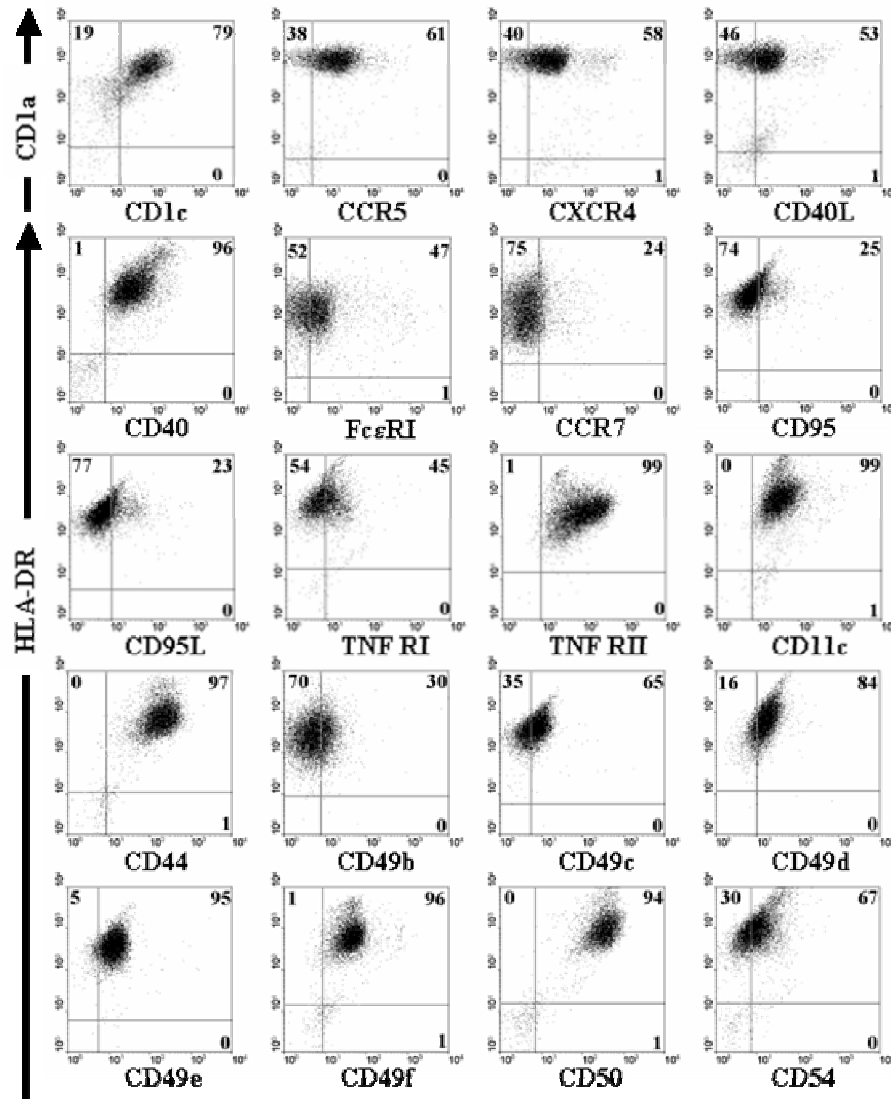
**Abb. 3: Zellgröße und Granularität der Säulenfraktionen.** (A) Dargestellt sind *scatter plots* der Vorwärts/Seitwärts-Lichtstreuung (FS/SS) von Zellen, die nicht in der Isolierungssäule zurückgehalten wurden, (B) Zellen, die in der ersten Säule zurückgehalten wurden, und (C) von Zellen, die in einer zweiten MACS-Säule positiv isoliert wurden.

Überraschenderweise konnte eine große Population von Zellen gefunden werden, die CD1a stark exprimierten und gleichzeitig positiv für das CD1c-Molekül waren (**Abb. 4**). In der 3-Farben-Fluoreszenz wurde die Expression von kostimulatorischen und Adhäsionsmolekülen, Chemokin- und Apoptose-assoziierten Rezeptoren detektiert (**Abb. 4**; CD83, CD86 und CD80 von Tag 0, **Abb. 13**).

Diese Antigene wurden von vielen LC exprimiert (hohe Positivität). Interessanterweise wurden die Antigene in keinem Fall mit sehr hoher Moleküldichte auf der Zelloberfläche gefunden (höhere Level der Expression). Relativ hohe Level der Expression konnten für den Hyaluronsäurerezeptor H-CAM (CD44), für ICAM-3 (CD50) und TNF-RII (CD120b) gemessen werden. Das kostimulatorische Molekül CD40 und die Adhäsionsmoleküle Integrin CR4 (CD11c) und VLA-6 (CD49f) waren auf mäßigem Niveau exprimiert.

Der überwiegende Teil der angereicherten Zellen war positiv für ICAM-1 (CD54), für VLA-3 (CD49c), VLA-4 (CD49d) und VLA-5 (CD49e), für CD40-Ligand (CD40L) und für die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5. Nur wenige Zellen zeigten Oberflächenexpression von B7.2 (CD86), CCR7, von dem Todesrezeptor Fas (CD95), Fas-Ligand (CD95L), TNF-RI (CD120a), FcεRI und VLA-2 (CD49b). Für kostimulatorisches B7.1 (CD80) und einen Marker, der mit DC-Maturation assoziiert ist, CD83, konnten nur geringe Expressionen gemessen werden.

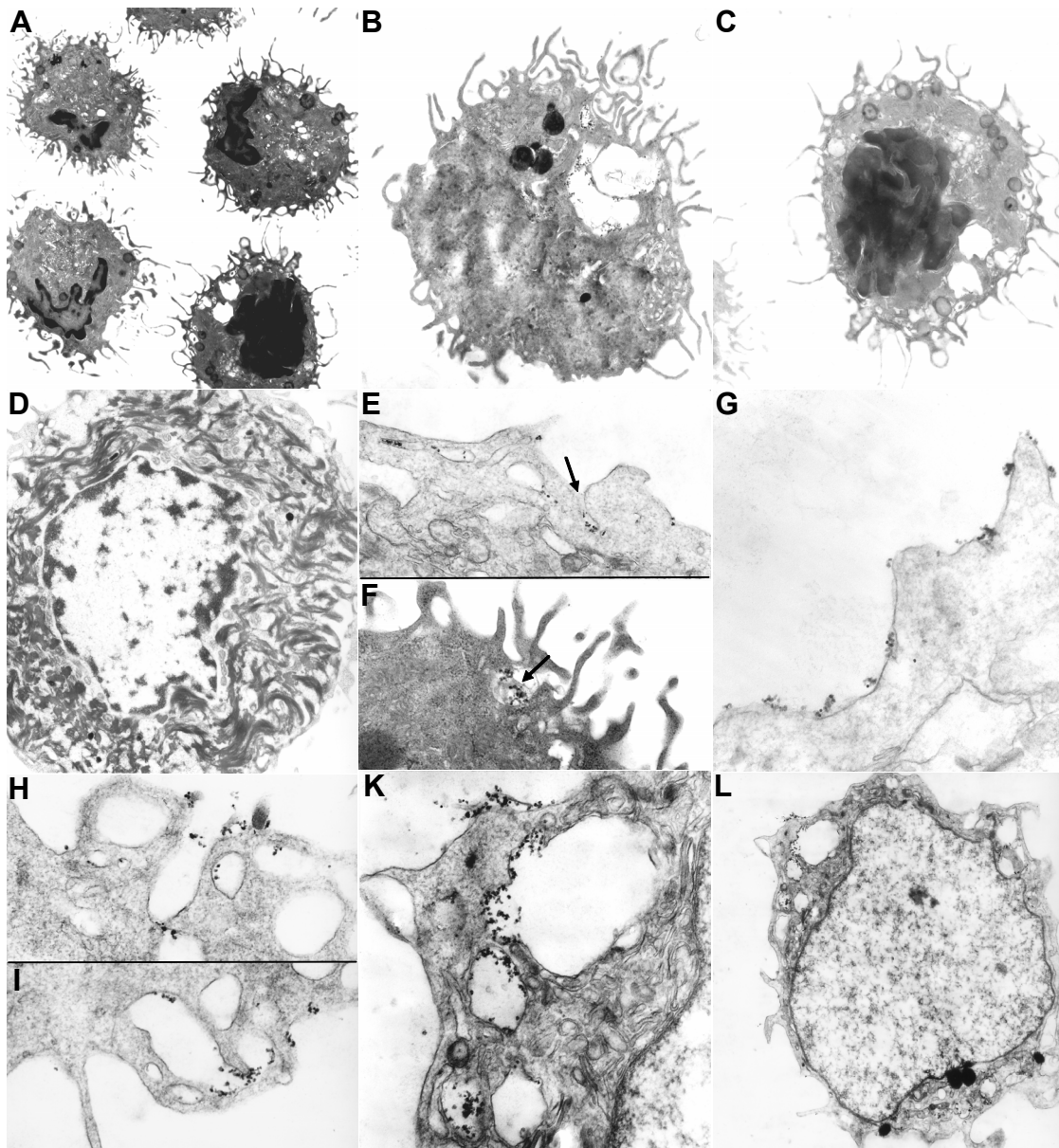




**Abb. 4: FACS-Analysen von CD1a-isolierten LC.** Gezeigt ist die Expression von Chemokinrezeptoren, Rezeptoren und Liganden von kostimulatorischen und Apoptose-assoziierten Molekülen und von Adhäsionsmolekülen. In jeder Messung wurden  $1 \times 10^5$  CD1c<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> Zellen von einem Spender ohne *gating* aufgenommen. Die Quadranten zeigen Färbungen mit Isotypenkontrollen, die Zahlen geben % positive Zellen an. Anti-CD1c, -CCR5, -CXCR4 und -CD40L waren nur in PE-Konjugation verfügbar und wurden deshalb nicht wie die anderen Moleküle als FITC-Färbung gegen HLA-DR-PE, sondern in der Doppelfärbung mit CD1a-Cy5 dargestellt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zehn voneinander unabhängige Experimente mit verschiedenen Spendern.

#### 4.1.3 Alle isolierten Zellen zeigen in der TEM die typische Morphologie von LC mit BG und gleichzeitig Oberflächen- und intrazelluläre CD1a-Expression

Neben der durchflusszytometrischen Analyse wurden die CD1a-isolierten LC auf der Ultrastrukturebene elektronenmikroskopisch untersucht. Dafür wurden die CD1a<sup>+</sup>Zellen sofort nach der Isolierung mit Immunogold angefärbt und fixiert. Bei der EM-Analyse in der Transmission der Ultra-Dünnschnitte konnte eine morphologisch homogene Zellpopulation ausgemacht werden, die wenig bis gar keine Kontamination mit Keratinozyten zeigte (**Abb. 5**). Die dendritischen Zellen waren durch einen mehrfach und tief gefurchten Kern und dünne Protrusionen gekennzeichnet. Diese Extensionen waren als Fortsätze aus der Zelloberfläche zu erkennen und enthielten keine Organellen. Im Zytoplasma jeder dieser dendritischen Zellen konnten Birbeck Granulae des stab- und auch des tennisschlägerförmigen Typs gefunden werden. Diese zelltypische Organelle identifizierte alle untersuchten Zellen als LC. Die Visualisierung der CD1a-Mikrobeads im EM durch Gold-markierte Sekundäntikörper zeigte Oberflächen- und intrazelluläre Markierungen. In hoher Vergrößerung konnte ein einzelnes Antikörper-Bead-Partikel mit Gold angefärbt dargestellt werden. Die intrazelluläre Markierung war auf endosomale und endoplasmatische Vesikel in unmittelbarer Nähe der Zellmembran und einiger Birbeck Granulae beschränkt. Andere endoplasmatische Membranen und Golgi-Bereiche waren nicht angefärbt. Direkt an den basalen Fortsätzen waren verdickte Membranbereiche im EM als *coated pits* zu erkennen. Verschiedene Endozytosestadien wie Einschnürung der Zellmembran zwischen den Fortsätzen, Partikeleinschluss und geschlossene Vesikel in Membrannähe konnten parallel in einer Zelle dargestellt werden. Die Vesikelmembran war ausschließlich auf der inneren Seite mit Goldpartikeln markiert.



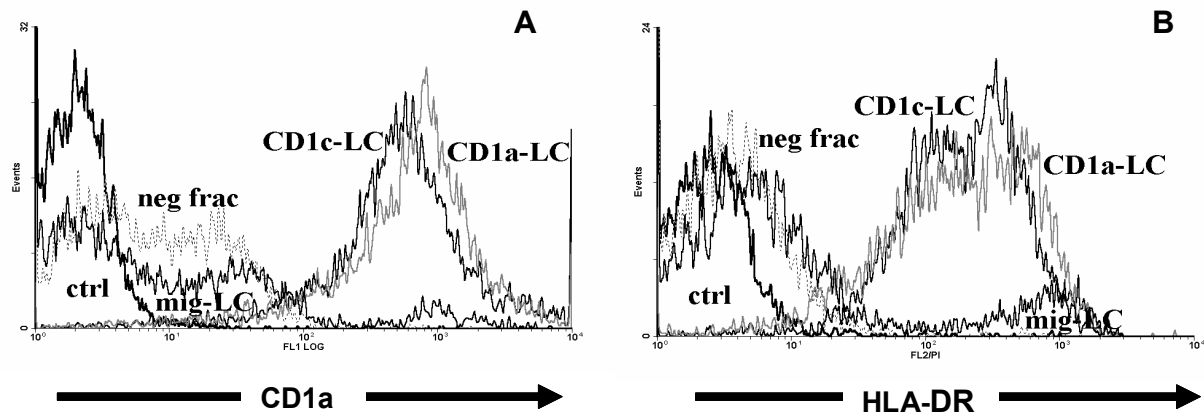
**Abb. 5: CD1a-Immungold gefärbte Zellen in der elektronenmikroskopischen Analyse.** (A) Gezeigt ist eine homogene Population von LC mit dünnen, kurzen Extensionen (Original-Vergrößerung x4.600). (B,C) Die LC waren insgesamt von integerer Ultrastruktur und zeigten einen gefurchten Nukleus, elektronendichte Lysosomen und große elektronendurchlässige Vakuolen. Mehrere Stapel von Birbeck Granulae der stabartigen Form akkumulierten nahe der Plasmamembran (x12.900, x7.750). (D) Einzelner Keratinozyt mit Tonofilamenten in der *shell*-Form (x10.000). (E, F) An der Zellmembran der LC können direkt an den Ansätzen der Extensionen mehrfach *coated pits* und endozytische Vesikel (Pfeile), die spezifisch Goldpartikel aufnehmen, erkannt werden (x27.800). (G) Mikroskopische Immunoelktronen-Visualisierung von CD1a-gekoppelten Mikrobeads zeigten ein heterogenes Anfärben der Zellmembran (x 46.500). (H, I) Goldpartikel in einer offenen, in einer geschlossenen Membranınvagination und in membran-nahen Vesikeln (x35.970). (K) Gleichzeitige Lokalisation von Goldpartikeln auf der Zelloberfläche und in *coated vesicles* und (L) in der Gesamtansicht der Zelle (x36.000, x10.000).

#### **4.1.4 Ein Antikörper gegen CD1c erhöht gegenüber Anti-CD1a die Zellausbeute und isoliert eine vergleichbare Population von CD1a<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> Zellen**

Da die FACS-Färbungen der CD1a-angereicherten Zellen neben HLA-DR auch hohe Expression für CD1c auf LC nachwiesen (**Abb. 4**), wurde getestet, ob sich dieses Molekül für die Isolierung von LC mit MACS eignen könnte. Wie bei der Positivselektion mit CD1a konnten mit Anti-CD1c (Klon AD5-8E7) humane LC aus der Suspension der enzymatisch vereinzelt epidermalen Zellen mit 99 % hoch angereichert werden (**Tabelle III**). Neben der hohen Reinheit wurden auch höhere Zellausbeuten erhalten als bei der Isolation mit Anti-CD1a. Insbesondere bei epidermalen Zellen ist die Reinheit von großer Bedeutung, da bereits wenige kontaminierende Keratinozyten die LC bei Langzeitkulturen rasch überwachsen. Der Prozess der Isolierung stellt einen Flux sowohl thermischer, chemischer (Enzyme) und mechanischer Reize dar, der die Keratinozyten nach einer kurzen Latenzphase in die Hyperproliferation treibt. Deshalb wurden in allen folgenden LC-Experimenten nur zweimal aufgereinigte Präparationen mit hoher, im FACS überprüfter Reinheit verwendet.

#### **4.1.5 CD1a- und CD1c-isolierte LC unterscheiden sich von Migrations-LC**

Es wurden frühere LC-Isolierungsversuche mit Zellen durchgeführt, die in der Kultur aus dem Hautgewebe spontan auswanderten (migrierte LC; LARSEN ET AL., 1990). Um die phänotypischen Eigenschaften von isolierten und migrierten LC direkt vergleichen zu können, wurde ein Versuchsprotokoll etabliert, das die Gewinnung beider Zellpopulationen von einem Spender ermöglichte. Dafür wurde ein Teil der epidermalen Streifen in Zellkultur-Medium inkubiert und migrierte, nicht-adhärenente Zellen als migrierte LC (mig-LC) zurückgewonnen. Aus dem anderen Teil der epidermalen Streifen wurden LC, wie vorher beschrieben, mit Anti-CD1c isoliert. Die Expressionsprofile von CD1a und HLA-DR waren für CD1a-LC und CD1c-LC nahezu identisch (**Abb. 6**).



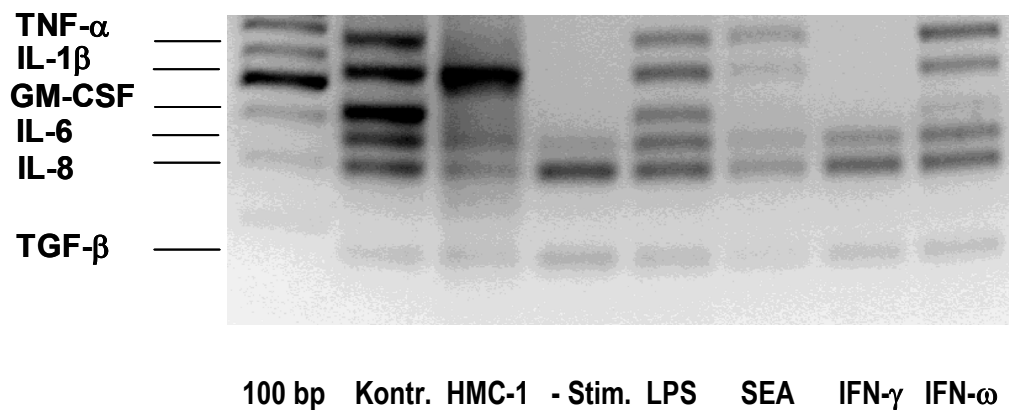
**Abb. 6: Phänotypischer Vergleich von CD1a-, CD1c-isolierten LC mit migrierten LC.** (A) FACS-Analyse der CD1a- (A) und HLA-DR- (B) Expression bei CD1a- und CD1c-isolierten Zellen (CD1a-LC, schwarze Linie und CD1c-LC, graue Linie). Außerdem gezeigt sind Expressionsprofile der Zellen, die nicht in der zweiten MACS-Säule zurückgehalten wurden (neg frac, gepunktete Linie), und die der migrierten Zellen (mig-LC, schwarze Linie, weniger positive). Alle Zellen stammten von einem Spender und wurden ohne elektronisches *gating* aufgenommen; Isotypenkontrolle, ctrl. Gezeigt sind die Histogramme eines Experiments, das repräsentativ für fünf weitere Versuche ist.

Die Negativfraktionen (neg frac) der zweiten Isolierungssäule enthielten Zellen, die sowohl schwach positiv für CD1a und HLA-DR waren. In der Expression von Oberflächen-Antigenen unterschieden sich mig-LC von CD1-isolierten LC.

Eine geringere Zahl der migrierten LC war positiv für CD1a und HLA-DR. Deshalb stellten migrierte Zellen eine Mischpopulation epidermaler Zellen mit geringem LC-Anteil dar. Wenige der migrierten Zellen zeigten CD1a mit vergleichbarem Intensitätsniveau der Fluoreszenz wie der Großteil der isolierten Zellen. Der Expressionslevel von HLA-DR in der kleinen HLA-DR<sup>+</sup> Population war gegenüber den CD1-sortierten Fraktionen erhöht. Durch magnetische Sortierung über CD1a und CD1c war im Vergleich mit der Auswanderungsmethode eine Isolierung von hochreinen, unreifen LC aus der Epidermis möglich.

#### 4.1.6 Isolierte LC exprimieren inflammatorische Zytokine nach Stimulation

Um inflammatorische Zytokine auf Transkriptionsebene untersuchen zu können wurde RNA der isolierten LC aufgereinigt, in cDNA umgeschrieben und in der RT-PCR analysiert. Messungen mit dem Bioanalyzer zeigten keine signifikante Degradierung der RNA von stimulierten LC. RiboGreen-Messungen ergaben bei isolierten LC aus humaner Epidermis eine durchschnittliche RNA-Ausbeute von 1-3  $\mu\text{g}/10^6$  LC. Da parallel der Einfluss mehrerer Stimuli auf verschiedene Zytokingene der LC untersucht werden sollte, wurde eine Multiplex-RT-PCR durchgeführt. Aufgereinigte LC exprimierten nach 4 h Kultur ohne Stimulation IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$  (**Abb. 7**). Bei Stimulation der LC desselben Spenders mit LPS, SEA oder mit einem Typ I Interferon, IFN- $\omega$ , wurde die Transkription von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  induziert. Stimulation mit LPS induzierte zusätzlich die Genexpression von GM-CSF. Stimulation mit einem Typ II Interferon, IFN- $\gamma$ , erbrachte keine Hochregulation der Zytokinexpression. Da keine humane LC-Zelllinie existiert, wurde die Zelllinie einer anderen Zelle aus der Haut, der Mastzelle, als Positiv-Zellkontrolle für die Expression inflammatorischer Zytokine eingesetzt. Im Vergleich mit unstimulierten Zellen der leukämischen Mastzelllinie HMC-1 exprimierten isolierte LC höhere Level von IL-8.

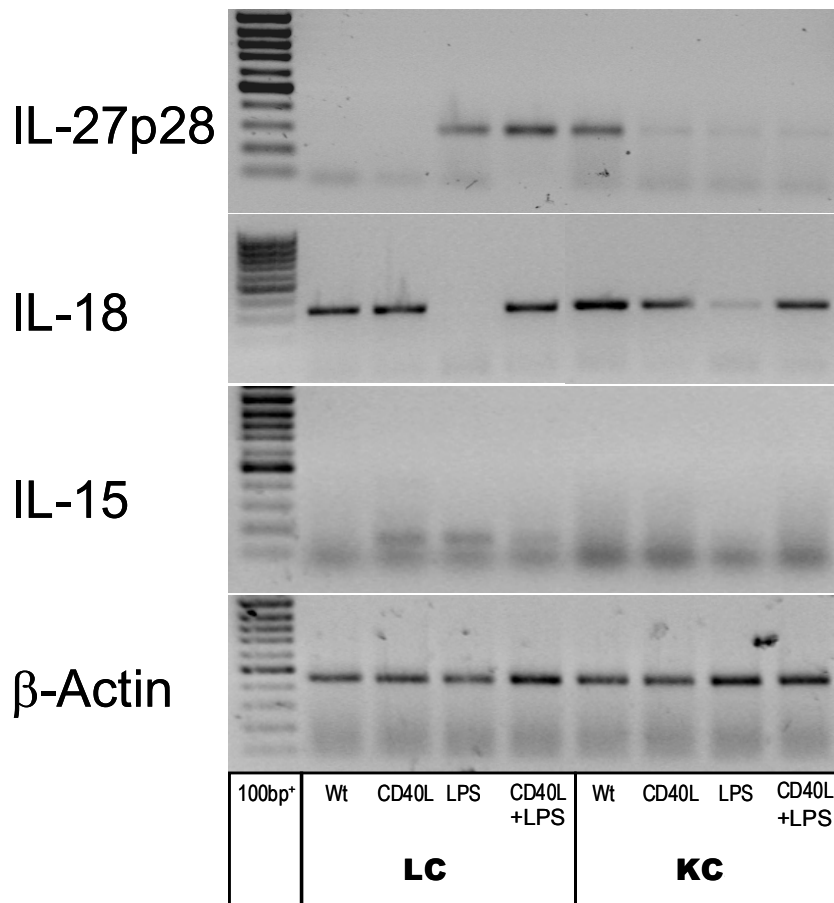


**Abb. 7: Multiplex PCR-Analyse der Expression inflammatorischer Zytokine.** Größenstandard (100 bp), Positivkontrolle (Kontr.) und die PCR-Produkte, amplifiziert aus der cDNA von HMC-1 Zellen (HMC-1) und von CD1c-sortierten LC, wurden elektrophoretisch in einem 2 % Agarose Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. LC wurden ohne Stimulation (-Stim.) oder mit 500 ng/ml LPS, 500 ng/ml SEA, 10 ng/ml IFN- $\gamma$  oder mit 10 ng/ml IFN- $\omega$  für 4 h in RPMI bei 37 °C inkubiert. Alle cDNA wurden über das *housekeeping*-Gen  $\beta$ -Actin abgeglichen (nicht gezeigt). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei Versuchen.

Die Transkription der Gene des Heterodimers IL-12p70, p35 und p40 wurde in einzelnen Analysen in der semiquantitativen RT-PCR bestimmt. Im Gegensatz zu den anderen gemessenen Zytokinen konnte LPS die Transkription der RNA-Moleküle von IL-12 nicht induzieren (nicht gezeigt). Auch eine zusätzliche Kostimulation der LC mit CD40L induzierte in der Zellkultur keine Transkripte von IL-12.

In weiteren RT-PCR-Analysen der RNA von stimulierten LC wurde die Expression von anderen Mitgliedern der IL-12-Familie heterodimerer Zytokine untersucht. Bei dem neu beschriebenen Zytokin IL-27 konnte hier erstmals die Untereinheit IL-27p28 in LC detektiert werden (**Abb. 8**). Transkripte der anderen IL-27-Untereinheit, *Epstein Barr virus-induced protein 3*, EBI3 wurden nur in Monozyten (nicht gezeigt), nicht aber in LC gefunden.

Die Expression von IL-18 wurde untersucht, da es zusammen mit IL-12 und IL-27 für die T<sub>H</sub>1-Differenzierung durch dendritische Zellen eine regulative Rolle spielt (TRINCHIERI, 2003). IL-18 wurde konstitutiv von LC und Keratinozyten exprimiert. Nach Stimulation mit LPS allein wurden Transkripte von beiden Zellen nicht mehr gezeigt. IL-15 ist ein Zytokin, das in der Peripherie bei T-Effektorzellen antigenunabhängig Zellteilung induzieren kann (SALLUSTO ET AL., 1999). Analysen mit RT-PCR zeigten bei LC und Keratinozyten keine Induktion von IL-15.

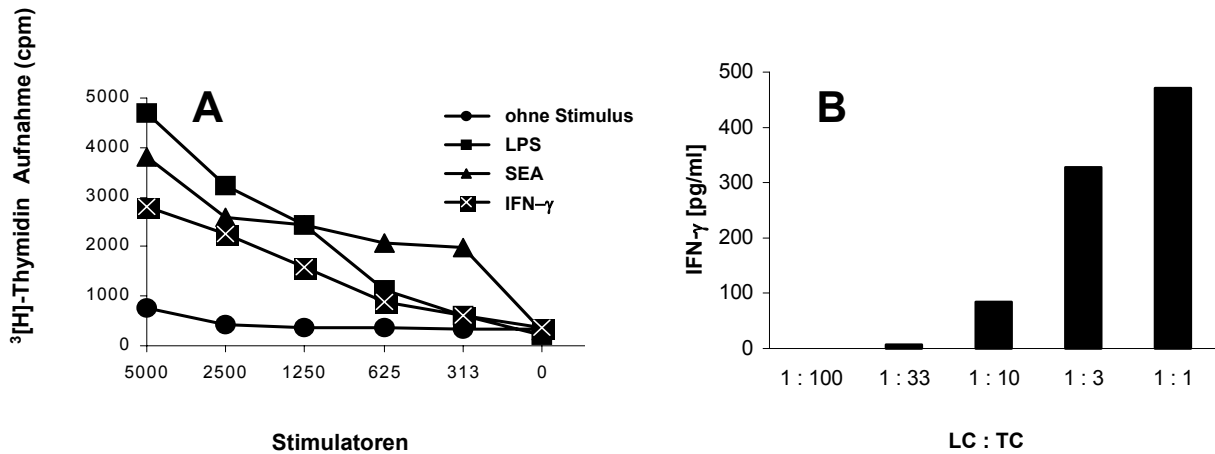


**Abb. 8: Expression von Zytokinen für die Differenzierung und Proliferation von T-Zellen in LC.** Aus den epidermalen Zellen eines Spenders wurden über CD1c LC positiv und Keratinozyten als Negativfraktion isoliert. Einzelne Kulturansätze wurden mit Wildtyp-Zellen, CD40L<sup>+</sup>Zellen, 1 µg/ml LPS oder CD40L<sup>+</sup>Zellen und LPS für 6 h stimuliert. Von den nicht-adhärenenten Zellen wurden danach Lysate, RNA und cDNA präpariert; Größenstandard (Spur 1).

#### 4.1.7 Isolierte LC besitzen die stimulatorische Kapazität funktionell intakter LC

Um die funktionale Integrität der LC nach dem Isolierungsprozess zu bewerten, wurden Proliferationsassays mit allogenen T-Zellen durchgeführt. Diese CD4<sup>+</sup> Zellen wurden aus *buffy coats* von verschiedenen Spendern über antikörpervermittelte Depletion der anderen Zellpopulationen gewonnen. Die Kapazität isolierter LC, naive allogene T-Zellen zu stimulieren, ist ein Nachweis für funktionelle Integrität und wurde in der gemischten Leukozytenreaktion (MLR) über den Einbau des radioaktiven Isotops <sup>3</sup>[H]-Thymidin in proliferierende Zellen quantifiziert. Frisch isolierte LC induzierten keine Proliferation der T-Zellen (**Abb. 9**).





**Abb. 9: Proliferation und IFN- $\gamma$  Sekretion von CD4<sup>+</sup>T-Zellen, die mit isolierten LC stimuliert wurden.** (A) Die LC eines Spenders wurden für einen Tag in Medium kultiviert oder wurden prästimuliert mit LPS (500 ng/ml), SEA (500 ng/ml) oder mit IFN- $\gamma$  (10 ng/ml) in RPMI/10 % FCS. Naive CD4<sup>+</sup> Zellen (99 % CD3<sup>+</sup>, 94 % CD4<sup>+</sup> im FACS gemessen) wurden mittels MACS-Depletion aus *buffy coats* isoliert. Abgestufte Zellzahlen von LC wurden kokultiviert mit  $5 \times 10^4$  T-Zellen. Die Proliferation alloreaktiver T-Zellen wurde über den Einbau von [<sup>3</sup>H]TdR als Triplikate gemessen. (B)  $10^5$  CD4<sup>+</sup>T-Zellen wurden angereichert und mit allogenen LC in den angegebenen Verhältnissen (LC:T-Zellen) für fünf Tage in RPMI/10 % FCS kokultiviert. Die Sekretion von IFN- $\gamma$  wurde aus dem Kulturüberstand der CD4<sup>+</sup>T-Zellen im ELISA gemessen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der Triplikate aus einem von insgesamt drei Experimenten.

LC, die mit LPS, SEA oder mit IFN- $\gamma$  stimuliert wurden, konnten T-Zellen auf mäßigem Level zur Proliferation bringen. Die Fähigkeit zur T-Zell-Stimulation konnte bei allen Spendern beobachtet werden. Das Ausmaß der gemessenen T-Zellteilung war jedoch bei allen Experimenten nie in dem Bereich, wie es von T-Zellen erreicht wird, die mit maturierten dendritischen Zellen stimuliert worden sind (CELLA ET AL., 1996). Mit zunehmender Anzahl kokultivierter LC wurde die Sekretion von IFN- $\gamma$  durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen verstärkt (Abb. 9). LC selbst sind nicht zur Produktion von IFN- $\gamma$  befähigt (TADA ET AL., 2003).

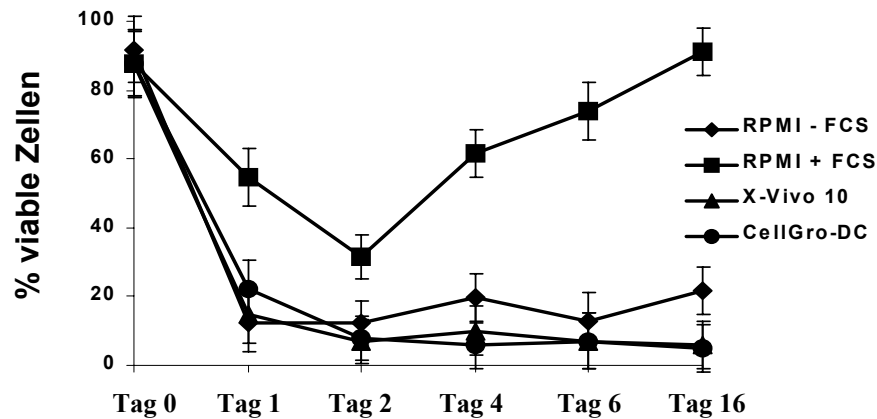
## 4.2 Viabilität und phänotypische Veränderungen in der Zellkultur

### 4.2.1 LC überleben in der Langzeitkultur in Anwesenheit von Serum

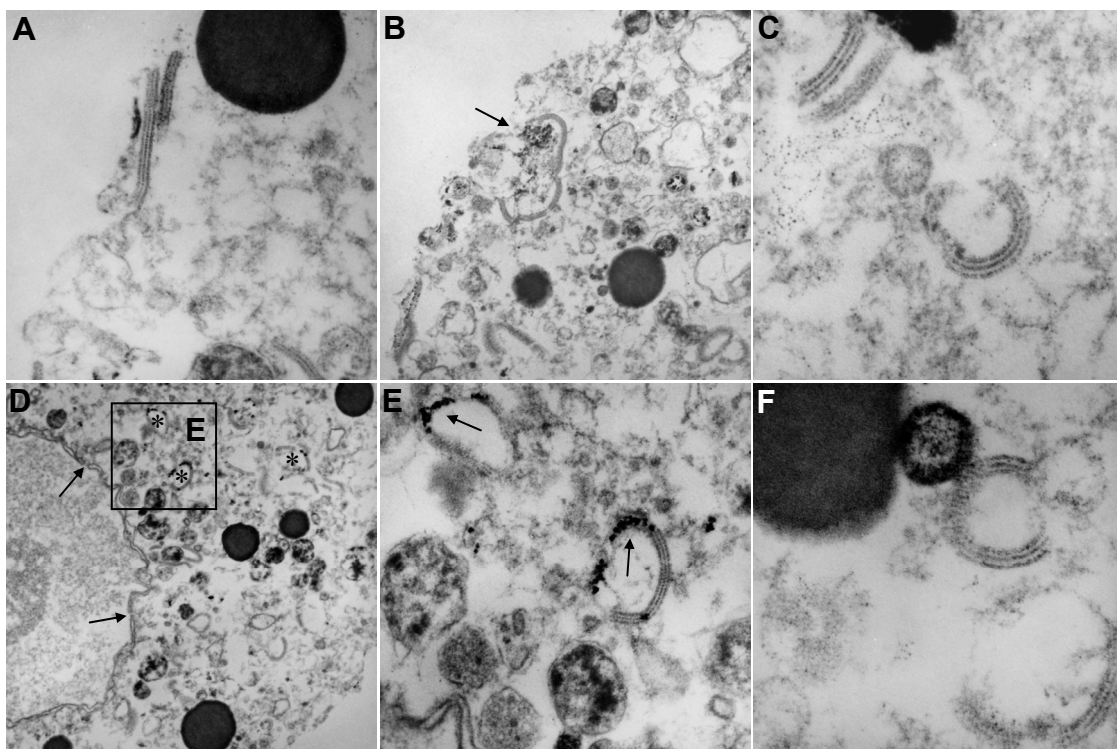
Es gibt wenige primäre Zellen, deren Zellkultur so kritisch ist, wie die von humanen, frisch isolierten LC. Um die Kulturbedingungen für CD1c-isolierte LC zu optimieren, wurden zuerst verschiedene Medien und die Abhängigkeit von Serumzugabe getestet. Frisch angereicherte LC wurden in RPMI mit und ohne 10 % FCS und in den Medien X-Vivo 10 und CellGro-DC parallel kultiviert. Letztere werden allgemein eingesetzt bei der *in vitro* Generierung von dendritischen Zellen unter serumfreien Bedingungen. In allen Medien wurde eine starke Abnahme der Viabilität der LC innerhalb der ersten beiden Tage in der Zellkultur beobachtet (**Abb. 10**). Danach überlebten die verbliebenen LC nur, wenn dem Kulturmedium RPMI 10 % FCS zugesetzt war. In der EM-Untersuchung dieser Langzeit-Survivor-LC konnten ungewöhnliche Birbeck Granulae (**Abb. 11**) gefunden werden. Diese hatten meist irreguläre Ringform und verlängerte Stapel-Formation. Ein Überleben der LC in serumfreier Kultur war weder mit X-Vivo 10 noch mit CellGro-DC möglich.

Direkt nach dem Aussetzen wurden die Zellen nur auf dem Boden und nicht im Überstand der Gewebekultur-Schalen gefunden und konnten von dort leicht, ohne die Verwendung von Trypsin, zurückgewonnen werden. Die Zellen verteilten sich erst gleichmäßig über die Bodenoberfläche, bildeten aber schon nach kurzer Zeit (ab 1 h) dichte Zellhaufen (Cluster), die im Medium schwimmend über meist einen langen Zellausläufer den Kontakt mit der Schalenoberfläche hielten und immobil in der Kultur blieben.

Nach 14 Tagen Kultur waren die LC ödematös geschwollen (**Abb. 11**), und die Integrität der Zytoplasmamembran war größtenteils aufgelöst. Die Zellmembran und die Ultrastruktur der Zelle zeigten nekrotische Charakteristika. Auffallend war das häufige Auftreten von Birbeck Granulae in der Ringform. Diese Birbeck-Ringe zeigten nur in einem Teilabschnitt spezifische Goldanfärbung. Dicht an der Zellmembran wurden BG in der Stabform gefunden. Weiter entfernt assoziierten gekrümmte BG zu einer offenen, ringartigen Struktur, und zum Nukleus hin konnten ausschließlich geschlossene Ringformationen ausgemacht werden.



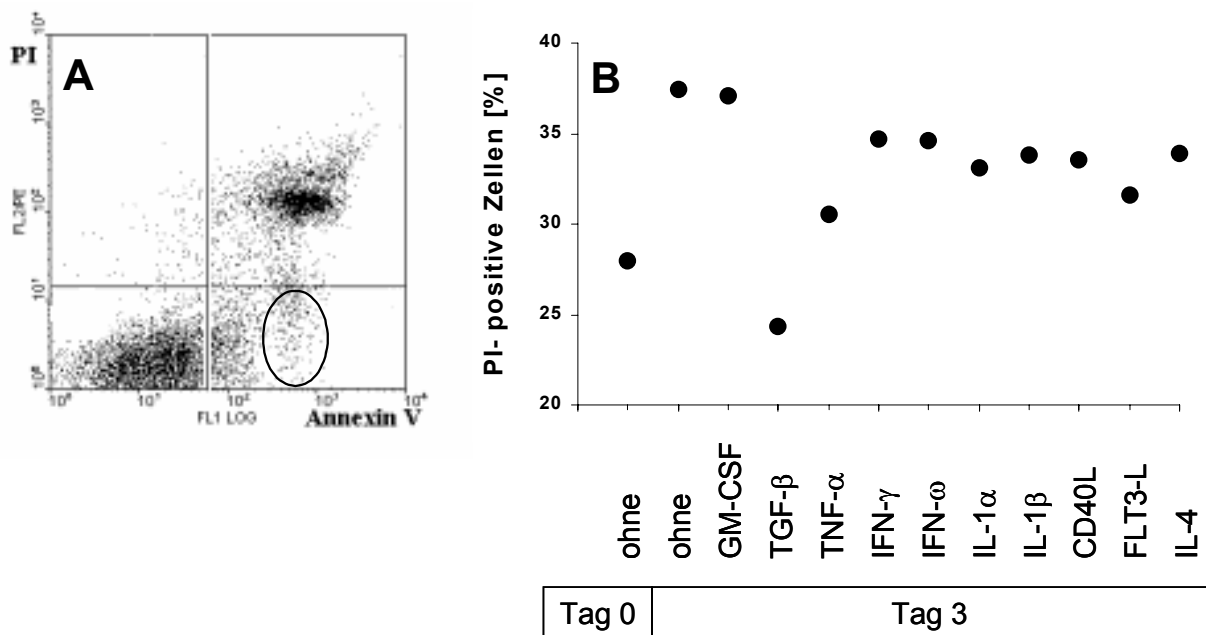
**Abb. 10: Abhängigkeit der LC-Viabilität von der Präsenz von Serum in der Zellkultur.** Jeweils  $1 \times 10^5$  LC von einem Spender wurden in den DC-spezifischen serumfreien Medien X-Vivo 10 und CellGro-DC oder in RPMI mit und ohne 10 % FCS kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet, mit  $0,2 \mu\text{g/ml}$  Propidiumjodid gefärbt und mit dem Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt sind die Werte der Triplikate eines Experiments von insgesamt vier mit vergleichbaren Ergebnissen.



**Abb. 11: Ödematisierung der LC und Birbeck-Ringbildung.** (A) Stabformationen von BG wurden nach 14 Tagen Kultur in der Nähe der Zytoplasmamembran gefunden ( $\times 50.000$ ). (B) Anlagerung gekrümmter BG, die mit CD1c-Immungold-Partikeln assoziiert sind ( $\times 20.000$ ). (C) In der Bildebene sind gekrümmte und ringförmige BG dargestellt ( $\times 85.000$ ). (D) Häufiges Vorkommen von Ring-BG (Sterne) und elektronendichten Lysosomen. Die Doppelmembran des Kerns zeigt an einigen Stellen Porenbildung (Pfeile,  $\times 12.000$ ). (E) Goldpartikel sind in den BG-Ringen lokal akkumuliert (Pfeile,  $\times 50.000$ ). (F) Formation aus ungefärbten Ring-BG und Lysosomen, die mit Goldpartikeln besetzt sind ( $\times 85.000$ ).

#### 4.2.2 Ein Teil der LC geht in die spontane Apoptose, Stimuli können die Viabilität der LC erhalten

Da einige LC den Todesrezeptor Fas (CD95) und FasL exprimierten (Abb. 4), wurde spontane Apoptose in der Zellkultur untersucht. Direkt nach der Isolierung wurden LC in die Zellkultur eingesetzt und an verschiedenen Zeitpunkten mit PI und Annexin-V doppelt gefärbt. Nach 24 h konnte eine diskrete Population von Zellen in Stadien später Apoptose oder nekrotisch tote Zellen (doppelt positiv) gefunden werden (Abb. 12 A). In der nur Annexin-V-positiven Fraktion der Zellen existierte eine mit schwacher und eine mit höherer Fluoreszenzintensität. Letztere, kleine Population repräsentierte den Anteil apoptotischer Zellen. Der Großteil der Zellen stirbt in der Zellkultur nekrotisch, während nur bei wenigen Zellen die Apoptose eingeleitet wird. Bei diesen Zellen tritt möglicherweise das Phänomen Anoikis auf. Anoikis beschreibt eine Sonderform apoptotischer Prozesse bei epithelialen Zellen, die aus ihrer Umgebung durch das Ablösen von Zellkontakten isoliert werden (FRISCH UND FRANCIS, 1994).



**Abb. 12: Apoptose-Induktion bei LC und Überlebensrate unter Einfluss von Zytokinen und Stimuli.** (A) Der Membranflip von Phosphatidylserin wurde im Durchflusszytometer mit Annexin-V gemessen. Isolierte LC waren nach 24 h Zellkultur in der Doppelfärbung mit Propidiumjodid entweder einfach positiv für Annexin-V (MFI >120 bei früh apoptotischen Zellen) oder doppelt positiv (spät apoptotische oder nekrotische Zellen). (B) Zytokine und CD40L wurden auf ihren Einfluss auf die LC-Viabilität getestet (10 ng/ml).

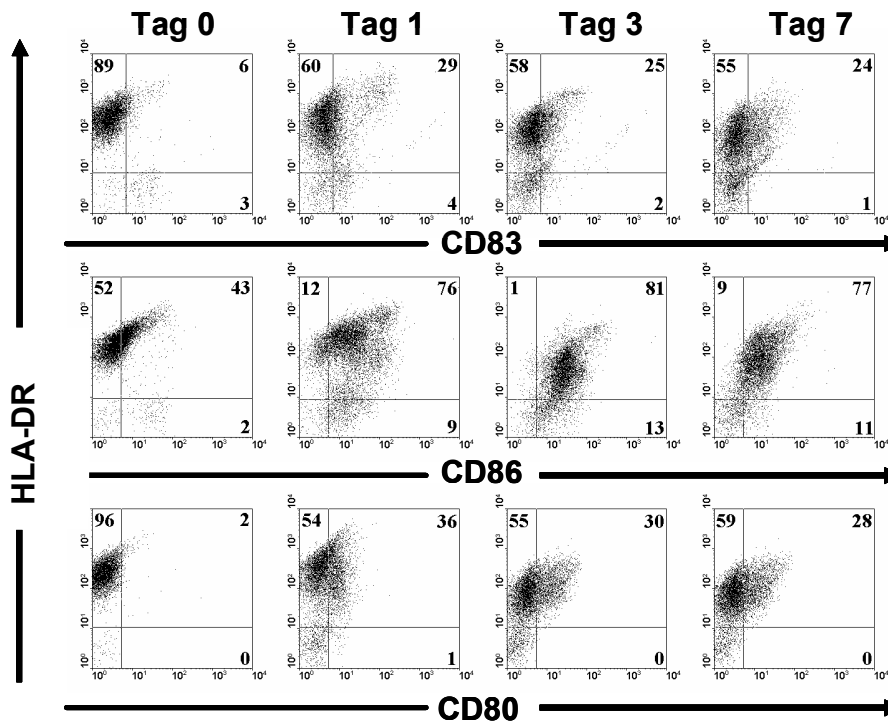
Da nur ein geringer Anteil isolierter LC in der Langzeitkultur überlebt, wurde der Einfluss von Zytokinen auf die Viabilität untersucht. Eine deutliche Verbesserung der Viabilität in der Kultur zeigte sich für TGF- $\beta$ , und auch TNF- $\alpha$  erhöhte die Überlebensrate der LC. PEGUET-NAVARRO ET AL. berichteten 1995, dass 68 % humaner LC, die durch konsekutiven Dichtegradienten aufgereinigt worden waren, für zwei Tage in der Zellkultur bei Präsenz von GM-CSF und CD40L im Medium überleben konnten. GM-CSF und das Protein-Trimer von CD40L ergaben bei CD1c-isolierten LC allerdings im Vergleich zur Medium-Kontrolle einzeln eingesetzt nur eine mäßige Verbesserung der Viabilität (**Abb. 12 B**).

#### 4.2.3 LC exprimieren CD83 und B7 auf geringem Niveau und konstant in der Zellkultur

Da LC in der gesamten epidermalen Zellpopulation nur mit einem Anteil von 1,9 % (BAUER ET AL., 2001) vorkommen, ist eine negative Selektion (Depletion) wegen der benötigten großen Menge an spezifischen Ak für Keratinozyten nicht geeignet, LC zu isolieren. Isoliert man Zellen positiv über Antikörperbindung, muss überprüft werden, ob diese Ligation den Phänotyp der Zelle verändert. Hier wurden nach der Selektion die Expression des Reifungsmarkers für dendritische Zellen, CD83, und die beiden kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 in der Langzeitkultur in RPMI mit 10 % FCS gemessen. Nach einem Tag neoexprimierten 30 % der Zellen CD83 auf niedrigem Niveau. Diese CD83-Expression erhielt sich während der weiteren Dauer der Zellkultur (**Abb. 13**). Ab Tag 3 jedoch wechselten Zellen mit höherem Expressionslevel zu einer Population mit niedriger Expression.

Die Analyse von CD86 zeigte fünf im *dot plot*-Diagramm differenzierbare Zellpopulationen an Tag 1. Eine hatte Expression auf hohem Level für CD86 und HLA-DR. Es konnten drei Populationen mit mäßiger CD86- und entweder hoher, mittlerer oder abwesender HLA-DR-Expression identifiziert werden. Eine Population zeigte keine Oberflächenmoleküle von CD86. Diese differenzierten Expressionsmuster verschwanden infolge fortdauernder Zellkultur. Wie an Tag 0 konnte wieder eine homogene Zellpopulation im FACS aufgenommen werden, die zu 80 % Moleküle von CD86 und HLA-DR an Tag 7 zeigte. Neoexpression von CD80 wurde bei 30 % der kultivierten Zellen gemessen.

Für CD1a konnte eine konstante Oberflächenexpression über eine Kulturperiode von 14 Tagen gemessen werden (nicht gezeigt). LC, die für 1, 3 und 7 Tage in Kultur gehalten wurden, zeigten, verglichen mit frisch isolierten LC, keine verstärkte stimulatorische Kapazität in MLR-Versuchen (nicht gezeigt).



**Abb. 13: Spontane Expression von B7 und CD83 in der Zellkultur.** Frisch CD1c-isolierte LC wurden über mehrere Tage in RPMI/10% FCS ohne Zugabe von Zytokinen oder Stimuli kultiviert. Die *dot plots* der FACS-Analysen zeigen den zeitlichen Verlauf der HLA-DR Koexpression mit B7 Molekülen und CD83 in LC von einem Spender. Die Quadranten geben die Färbung mit Isotypenkontrollen an, die Zahlen geben % positive Zellen wieder. Gezeigt sind repräsentative *dot plots* für drei voneinander unabhängige Experimente.

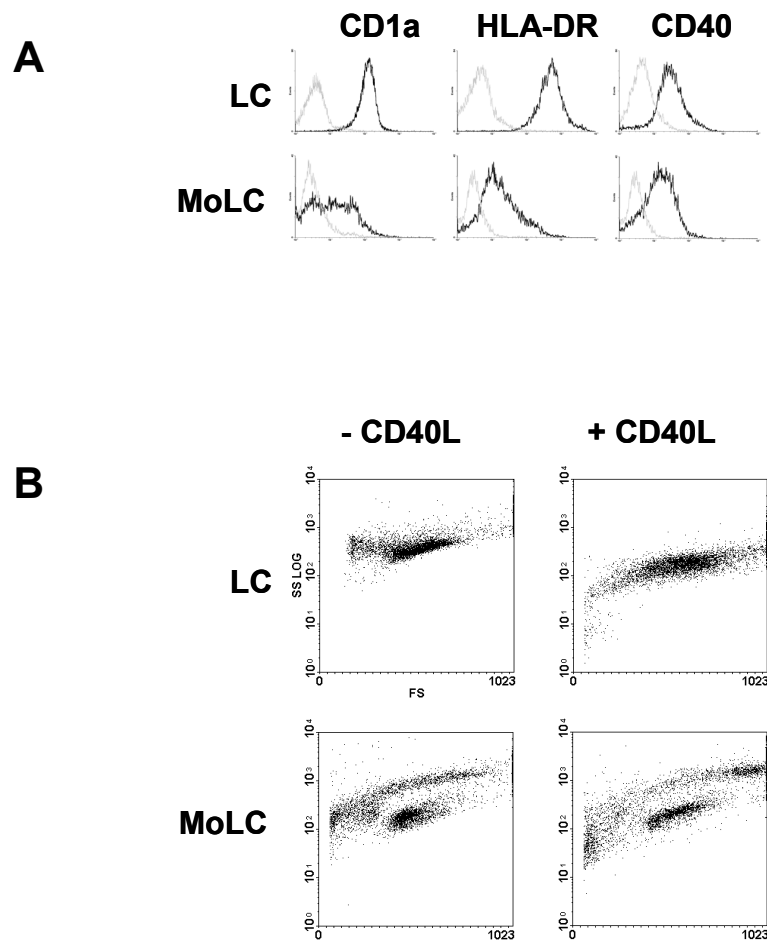
### 4.3 Stimulation von isolierten LC im direkten Vergleich mit generierten Zellen des MoLC-Modells

#### 4.3.1 LC und MoLC exprimieren CD40 auf vergleichbarem, CD1a und HLA-DR auf unterschiedlichem Niveau

Um beide Populationen von dendritischen Zellen zu vergleichen, wurde der Phänotyp CD1c-sortierter epidermaler LC und der von MoLC in der Durchflusszytometrie analysiert. Dafür wurden die epidermalen Zellen aus humaner Haut präpariert. Die MoLC wurden aus adhärenen Monozyten durch sechs Tage *in vitro*-Kultur mit GM-CSF, IL-4 und TGF- $\beta$  entsprechend einem etablierten Protokoll (GEISSMANN ET AL., 1998) generiert. Aus der Population der epidermalen Zellen und aus der Population der MoLC wurden dann parallel CD1c-positive Zellen durch MACS isoliert. Die Selektion ergab eine homogene Fraktion der LC, die hohe Level CD1a und HLA-DR exprimierten (**Abb. 14**).

Die MoLC dagegen teilten sich in der *scatter*-Analyse in Subpopulationen mit heterogener Oberflächenexpression von CD1a und HLA-DR auf. Nach der Sortierung der MoLC unterschieden sich die angereicherten CD1c<sup>+</sup>MoLC durch höhere Expression von HLA-DR und Langerin von den CD1c<sup>-</sup>MoLC (nicht gezeigt).

Beide CD1c-isolierten Zellpopulationen, die LC und die MoLC, zeigten mittlere Expression von CD40. Nach der Kokultur mit der adhären wachsenden, CD40L-transfizierten Fibroblastenzelllinie TRAP konnten die nicht-adhärenen LC und MoLC effizient zurückgewonnen werden. In den *scatter*-Darstellungen konnten nur geringe Veränderungen in Größe, Granularität und Viabilität unter dem Einfluss von CD40L ausgemacht werden (**Abb. 14**).



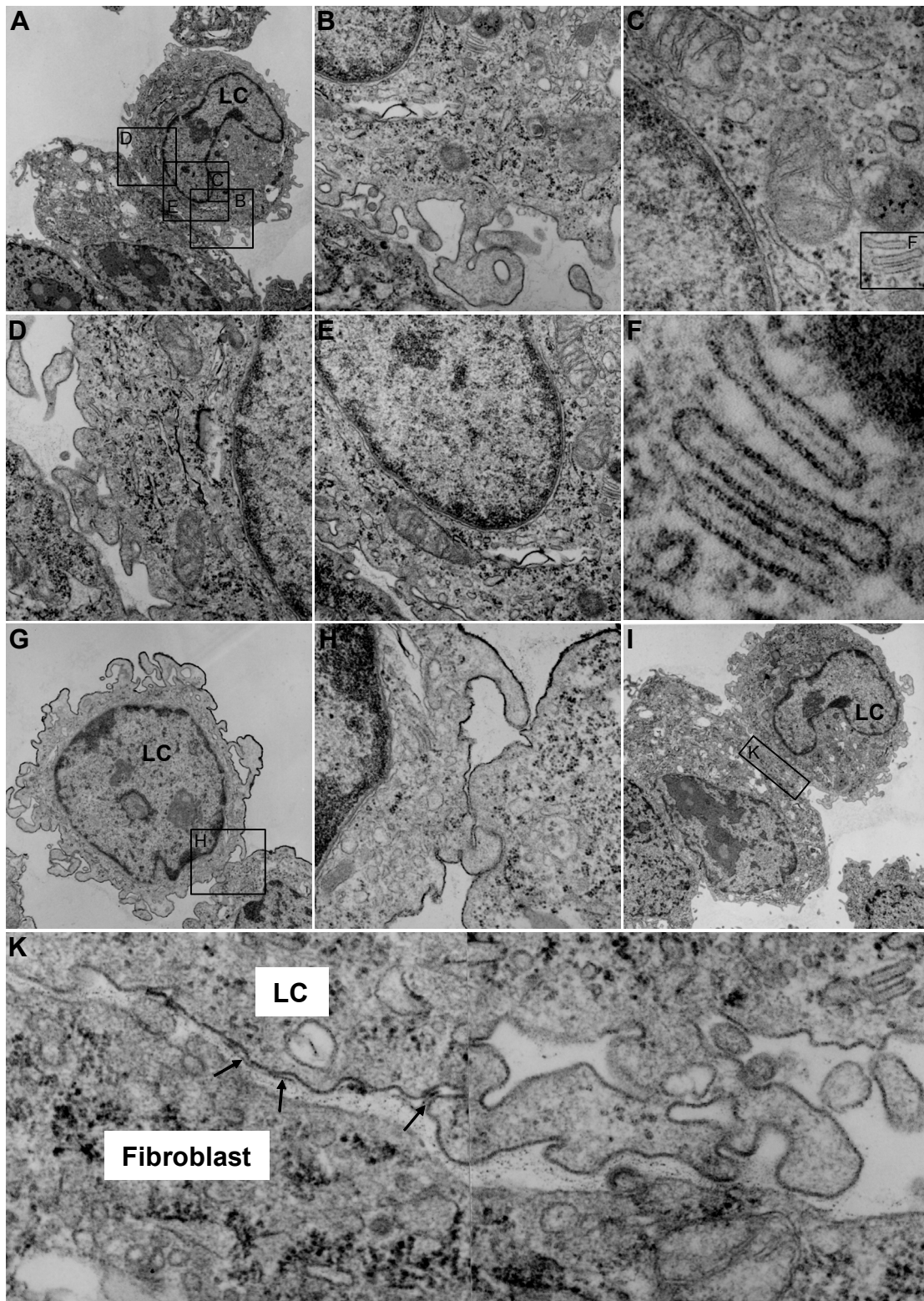
**Abb. 14: Vergleich der Oberflächenexpression von CD1a, HLA-DR, CD40 und der *scatter*-Profile bei epidermalen LC und MoLC.** (A) Die epidermalen LC und MoLC, die in einer 6-Tage-Kultur mit GM-CSF, IL-4 und TGF- $\beta$  aus Monozyten generiert worden waren, wurden mit CD1c sortiert (CD1c<sup>+</sup> LC, CD1c<sup>+</sup> MoLC, schwarze Linie; Isotypenkontrolle, graue Linie). Die isolierten LC und MoLC wurden auf einer Schicht aus adhärenenten hCD40L-transfizierten murinen L-Zellen oder auf dem Plastikboden allein ausgebracht. Die Histogramme und (B) *scatter*-Diagramme zeigen FACS-Analysen von 5000 Zellen ohne die Verwendung einer automatischen Vorsortierung über die Einstellung eines *gate*.



#### 4.3.2 LC zeigen in der Ultrastruktur nach Ligation von CD40 Anzeichen von Zellaktivierung

Die Untersuchungen der Ultrastruktur wurden nach 18 h Kokultur angestellt und zeigten Zellcluster, die sich aus CD40L<sup>+</sup>Fibroblasten und den in ihrer Morphologie typischen LC zusammensetzten (**Abb. 15**). Bei den LC war eine große Anzahl der charakteristischen Birbeck Granulae zu erkennen. Auffallend waren des Weiteren endozytotische Vesikel, endoplasmatische Membranen, zahlreiche Mitochondrien und vergrößerte, im Vergleich zu den Analysen frisch isolierter LC (**Abb. 5**) deutlich abgerundete Zellkerne. Die Zellmembranen von LC und Fibroblast passten sich in der morphologischen Oberflächenstruktur auffallend aneinander an und bildeten Bereiche mit verdickter Zellmembran (Adhärenzkontakte, **Abb. 15 K**) aus.

Darüber hinaus zeigten LC mit engem Kontakt zu den Fibroblasten verstärkt endozytotische Vesikel. Ihre interdigitierenden Plasmamembranen bildeten zahlreiche Membran-Invaginationen und zytoplasmatische Protrusionen. Kleine interzelluläre Vesikel konnten im Zwischenraum von LC und Fibroblast erkannt werden. Insgesamt zeigten die LC deutliche Hinweise auf einen aktivierten Zustand der Zellen und auch auf aktive Interaktionen mit den Fibroblasten.



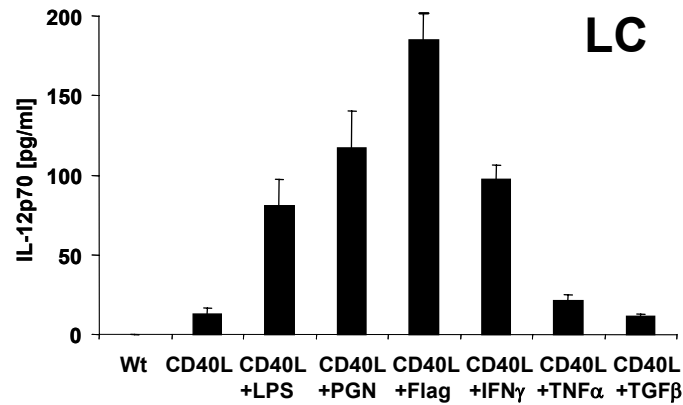
**Abb. 15: Interdigionen und Membranlagerungen in der Transmissions-EM.** Die epidermalen LC wurden mit vor-adhärierten CD40L<sup>+</sup>Zellen kokultiviert. **(A)** Die Aufnahme zeigt den Zellkontakt einer LC, die durch das Auftreten zahlreicher Birbeck Granulae identifiziert werden kann, mit zwei CD40L<sup>+</sup>Fibroblasten (x4.400). **(B)** Der Bildausschnitt zeigt in höherer Vergrößerung die nah beieinander liegenden, interdigitierenden

Plasmamembranen der CD40L<sup>+</sup>Zelle (obere Zelle) und der LC (untere Zelle). Zytoplasma-Protrusionen in verschiedenen Anschnitten (x20.000). **(C)** Lokalisation der Organellen mit Doppelmembran Nukleus und Mitochondrien und der Organelle BG mit trilaminarer Membran (x50.000). **(D)** Oberes Ende des interzellulären Spalts mit Mitochondrien in Nähe des Kerns der LC (x20.000). **(E)** Enge Membrananlagerung zwischen Fibroblast und LC. Interzellularräum, u. l.; helle Myelinfigur in Kernnähe (x20.000). **(F)** Drei stabförmige BG mit deutlicher trilamellarer Struktur (x250.000). **(G, H)** Die ganze Ansicht und Ausschnitt H zeigen eine lokal begrenzte Zellanlagerung mit diskretem Kontakt. Eine LC-Extension passt sich in die Membraneinbuchtung des Fibroblasten ein und bildet Bereiche mit Adhäsionskontakten aus (Pfeile; x4.400, x20.000). **(I, K)** Übersicht und Vergrößerung des interzellulären Spalts mit Adhäsionskontakten zwischen beiden Zellen. Mehrere Interdigitationen im Interzellularräum und große Mengen rER im Zytoplasma beider Zellen sind zu erkennen (x4.400, x20.000).

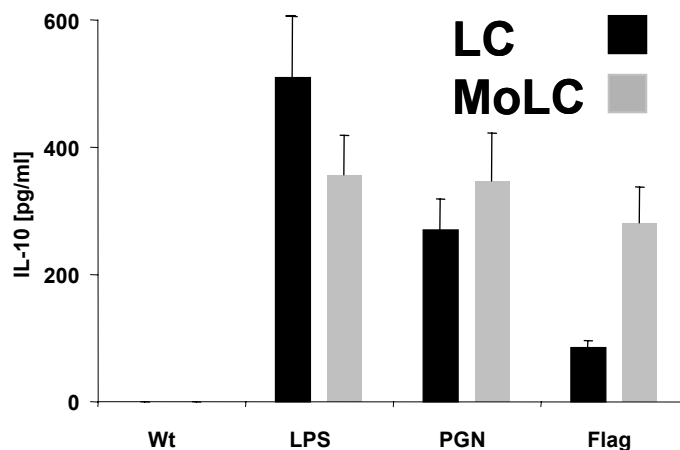
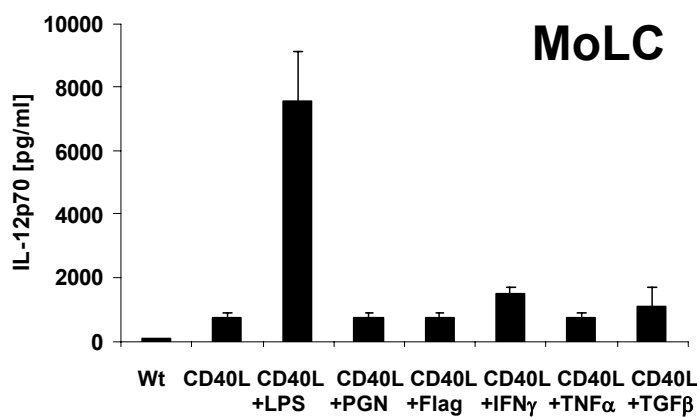
### 4.3.3 Nach Stimulation werden große Mengen IL-12 von MoLC, IL-10 auch von LC sezerniert

Die Zytokine IL-12p70 und IL-10 können nach Stimulation von dendritischen Zellen sezerniert werden und stellen prominente Vertreter für die Induktion einer T<sub>H</sub>1- bzw. T<sub>H</sub>2-Antwort dar. Humane LC können die IL-12 Untereinheit p40 exprimieren (KANG ET AL., 1996), über IL-10 ist sowohl in isolierten wie in generierten LC nichts bekannt. Hier wurde ein Vergleich der Potenz von MoLC mit der von LC, IL-12p70 und IL-10 zu sezernieren, angestellt. Beide Populationen wurden mit CD40L<sup>+</sup>Zellen kokultiviert und zusätzlich stimuliert mit den Liganden Peptidoglykan für TLR2, LPS für TLR4, Flagellin für TLR5 oder mit Zytokinen. Sowohl MoLC als auch LC zeigten keine bedeutende spontane IL-12-Sekretion (**Abb. 16**). Die Kokultur mit CD40L<sup>+</sup>Zellen führte zu mäßiger IL-12p70-Sekretion bei MoLC. Dieser Effekt konnte deutlich durch eine zusätzliche Stimulation mit LPS verstärkt werden.

Bei den LC konnte eine geringe IL-12-Sekretion von unter 200 pg/ml nach Kostimulation der Zellen mit CD40L und Flagellin, Peptidoglykan, LPS oder IFN- $\gamma$  beobachtet werden. Bemerkenswerterweise konnten MoLC und LC hohe Level von IL-10 sezernieren. Große Mengen IL-10 wurden gemessen, nachdem die Zellen mit Flagellin, Peptidoglykan oder LPS stimuliert worden waren (**Abb. 17**).



**Abb. 16: Sekretion von IL-12p70 von stimulierten LC und MoLC.** Freisetzung geringer Mengen von IL-12p70 in den Kulturüberstand von LC und großer Proteinmengen in den Überstand von MoLC. Die Zellen wurden mit CD40L<sup>+</sup>Zellen kokultiviert und zusätzlich mit TLR-Liganden oder mit Zytokinen stimuliert. Die Detektion erfolgte durch einen ultrasensitiven ELISA nach 18 h Stimulation von 10<sup>6</sup> Zellen/ml. Die Daten repräsentieren vier und drei voneinander unabhängige Experimente.



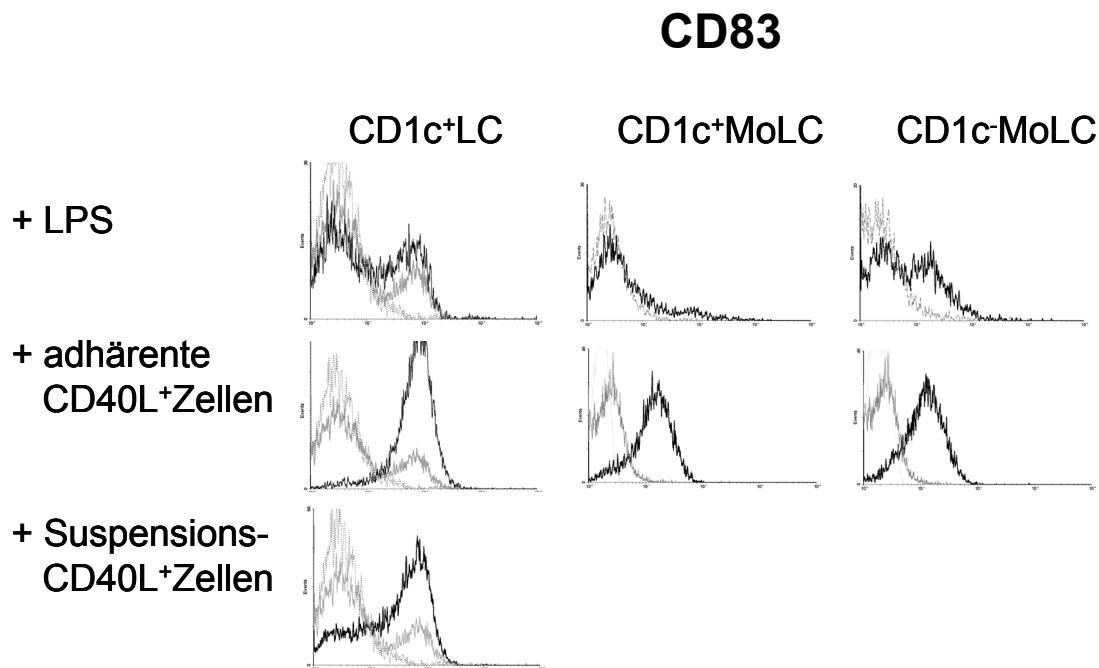
**Abb. 17: Sekretion von IL-10 von stimulierten LC und MoLC.** IL-10 wird von LC und MoLC nach Stimulation mit LPS, Peptidoglykan oder Flagellin sezerniert. Die Detektion erfolgte durch ELISA nach 18 h Stimulation von 10<sup>6</sup> Zellen/ml. Die Daten repräsentieren drei Experimente.

#### 4.3.4 CD83 wird auf MoLC und auf epidermalen LC in Abhängigkeit vom Stimulus unterschiedlich induziert

Bei frisch isolierten LC konnte durch Stimulation mit LPS die Transkription von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  induziert werden (nicht gezeigt). LPS regulierte auf epidermalen LC auch CD83 hoch (**Abb. 18**), ein Molekül, das mit der Reifung dendritischer Zellen assoziiert ist (ZHOU UND TEDDER, 1995). Andere einzelne Stimuli wie IFN- $\gamma$  oder ein Trimer von CD40L induzierten kein CD83 auf CD1c-sortierten LC (nicht gezeigt).

Erst als LC mit adhären CD40L<sup>+</sup>Zellen kokultiviert wurden, begannen sie die Oberflächenexpression von CD83 zu verstärken. Nach 18 h Stimulation wurde ein Großteil der LC-Population positiv für diesen Marker (94 %). Nach dieser Zeit konnten die LC nicht-adhären auf dem Boden der Kulturschalen gefunden werden. Auch durch die Kokultur mit einer CD40L-transfizierten Suspensions-Zelllinie (J558L) neoexprimierten 70 % der LC CD83. Eine spontane Reifung auf mittlerem Level wurde in Kontrollansätzen mit Medium nach 18 h beobachtet und verstärkte sich nicht nach weiterer Kultur (**Abb. 13**). Die adhären CD40L<sup>+</sup>Zellen stimulierten die MoLC in der CD1c<sup>+</sup> und auch in der CD1c<sup>-</sup> Subpopulation zur Expression vergleichbarer Level von CD83 (**Abb. 18**).

Im Gegensatz zur exklusiven Expression von CD83 bei den epidermalen Zellen auf der CD1c<sup>+</sup> Subpopulation, zeigte bei den MoLC nach Stimulation mit LPS die Fraktion der CD1c<sup>-</sup> Zellen CD83 auf der Zelloberfläche. Die CD1c<sup>+</sup> Zellen hatten sehr geringe Expression von CD83. Anders als für das Potenzial der MoLC, IL-12 zu sezernieren (**Abb. 16**), konnte für den Expressionslevel von CD83 kein synergistischer Effekt von CD40L und LPS beobachtet werden (nicht gezeigt).

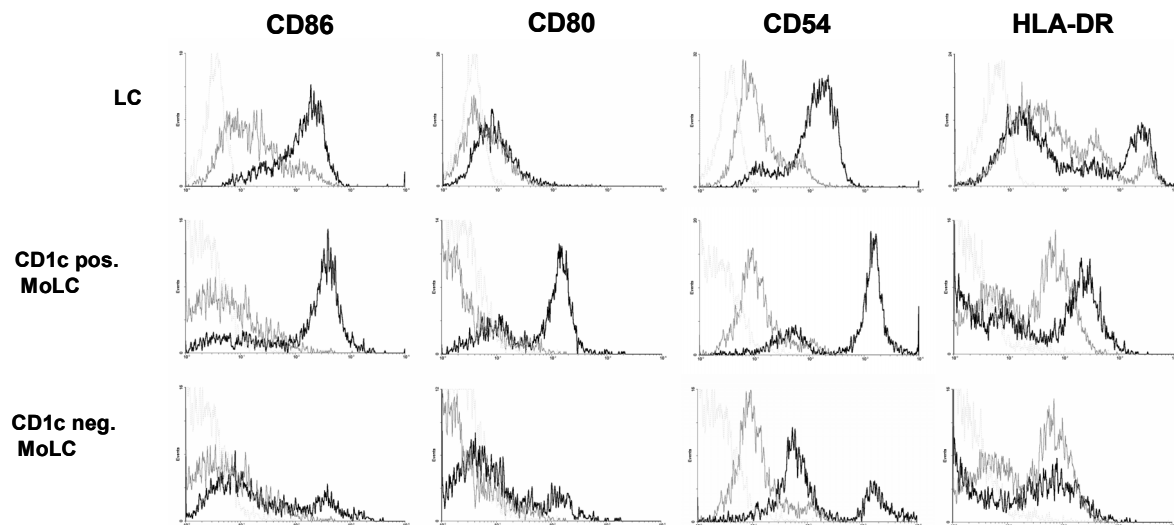


**Abb. 18: Hochregulation von CD83 auf epidermalen LC und CD1c-sortierten MoLC-Populationen.** Isolierte LC wurden aktiviert mit CD40L-transfuzierten L-Zellen (TRAP, adh rent 2:1), mit J558 L-Zellen (nicht-adh rent 1:2) und mit 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS. MoLC wurden über CD1c isoliert, mit CD40L<sup>+</sup>Zellen und mit 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS stimuliert. Nach 18 h Aktivierung wurden alle Zellen zurückgewonnen und mit Anti-HLA-DR und Anti-CD83 gefärbt. Die Histogramme zeigen die Expression von CD83 bei HLA-DR<sup>+</sup> Zellen, die durch ein *gate* vorsortiert worden sind. In den FACS-Analysen wurden 10.000 Zellen aufgenommen. Die Histogramme zeigen Ergebnisse von einem Spender, die in fünf Wiederholungen mit anderen Spendern bestätigt wurden; CD1c<sup>+</sup>, über MACS positiv isolierte Zellen; CD1c<sup>-</sup>, MACS-Negativfraktion; mit CD40L stimuliert, schwarz; mit Wt stimuliert, grau; Isotypenkontrolle, gepunktet.

#### 4.3.5 Kreuzbindung von CD40 reguliert CD80, CD54 und HLA-DR in CD1c<sup>+</sup>LC hoch

Parallel wurden LC aus humaner Haut und MoLC an Tag 6 mit CD1c-MACS isoliert, und die separierten Fraktionen wurden mit CD40L<sup>+</sup>Zellen stimuliert. Durchflusszytometrische Analysen zeigten, dass nur die CD1c<sup>+</sup> MoLC zu CD80-hoch-exprimierenden Zellen stimuliert werden konnten (**Abb. 19**). Das kostimulatorische CD86 wurde von der CD1c-positiven Fraktion der MoLC und der LC erworben. Die CD1c<sup>+</sup> MoLC teilten sich auf in eine große Population, die CD54 auf hohem Level, und in eine kleine Population, die CD54 auf geringerem Level exprimierten. Eine umgekehrte Verteilung zeigte sich für dieses ICAM-1-

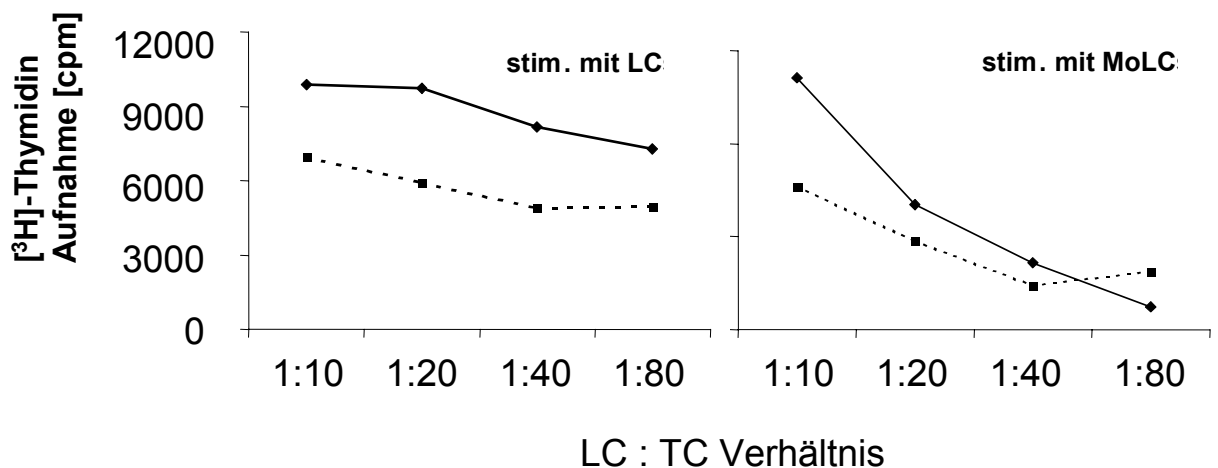
Molekül auf CD1c<sup>-</sup> MoLC. Im Vergleich zu der Stimulation mit L-Zellen des Wildtyps wurden CD54 und CD86 auf epidermalen LC nach der Ligation von CD40 deutlich hochreguliert (**Abb. 19**). Die Profile der Expression von HLA-DR zeigen eine stimulierte LC-Population mit hohen Intensitäten, eine mäßig stimulierte Population der CD1c<sup>+</sup> MoLC und keine Zunahme von HLA-DR bei den CD1c<sup>-</sup> MoLC.



**Abb. 19: Phänotyp-Veränderungen bei LC und MoLC nach Stimulation mit CD40L.** Der Ligand von CD40 induzierte verschiedene Level der Antigenexpression bei LC und MoLC. Eine CD1c-Isolierung wurde mit epidermalen Zellen an Tag 0 und MoLC nach sechs Tagen Kultur mit GM-CSF, IL-4 und TGF- $\beta$ 1 durchgeführt. Die Zellen wurden auf einer Schicht adhärenter CD40L<sup>+</sup>Zellen ausgebracht und 18 h kokultiviert. Die Histogramme zeigen den Phänotyp im *gate* sortierter HLA-DR<sup>+</sup> Zellen (CD86, CD80 und CD54) und CD1c<sup>+</sup> Zellen (HLA-DR) nach der Rückgewinnung von den Kulturplatten. Die FACS-Analysen von 10.000 Zellen eines Spenders repräsentieren die Ergebnisse von fünf unabhängigen Experimenten; mit CD40L stimuliert, schwarz; mit Wt stimuliert, grau; Isotypenkontrolle, gepunktet.

#### 4.3.6 Ligation von CD40 auf MoLC und LC verstärkt die stimulatorische Kapazität in der MLR

Das Potenzial, naive allogene CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu stimulieren wurde für MoLC und LC gemessen. Die Zellen waren zuerst für 18 h mit CD40L-transfizierten oder Wildtyp-Fibroblasten kultiviert worden. Trotz der spenderabhängigen Abweichungen in der absoluten proliferativen Antwort induzierten die CD40L-stimulierten LC und MoLC in allen Versuchen massivere T-Zell-Proliferation als die Zellen, die mit den Wildtyp-Kontrollen kokultiviert worden waren (Abb. 20). Die Zunahme der stimulatorischen Kapazität war jedoch im Vergleich zu Ergebnissen mit terminal reifen humanen LC (CAUX ET AL., 1992) von geringem Ausmaß.



**Abb. 20: Proliferation von CD4<sup>+</sup>T-Zellen in der MLR nach Kreuzbindung mit CD40L auf epidermalen LC und MoLC.** LC und MoLC wurden über CD1c isoliert und mit CD40L<sup>+</sup>Zellen für 18 h kokultiviert. Nach dem Ernten der nicht-adhärenenten LC wurden diese als Stimulatoren in abgestuften Zellzahlen mit 5x 10<sup>4</sup>/Napf allogenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen für fünf Tage kokultiviert. Die T-Zellen wurden aus PBMC verschiedener Spender über Depletion mit MACS angereichert (94 % CD4<sup>+</sup>, 99 % CD3<sup>+</sup>) und mit LC oder MoLC stimuliert. Die Ergebnisse der Thymidin-Aufnahme sind dargestellt als Mittelwerte der Triplikate der Ereignisse pro Minute (cpm) und repräsentieren drei unabhängige Experimente.

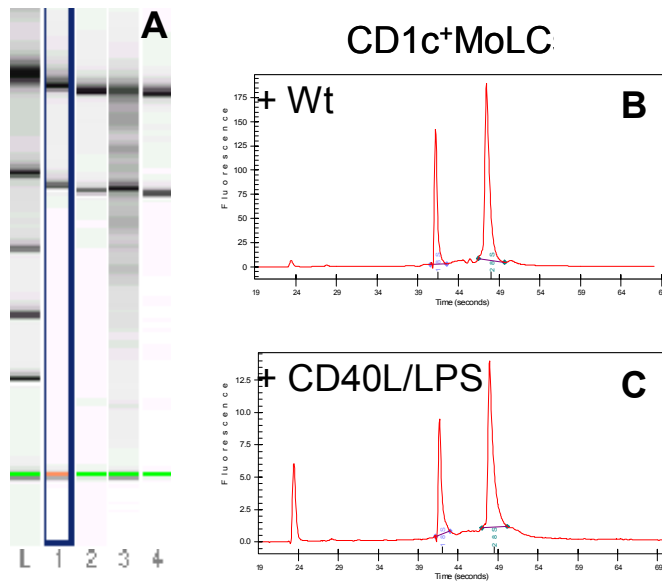


#### 4.4 Analyse der Genexpression von MoLC nach Simulation mit LPS und CD40L mittels Mikroarray

Während zahlreiche Untersuchungen zur Genexpression von dendritischen Zellen existieren, fehlen diese für humane LC bis dato. Um ein Profil der Genexpression nach Stimulation mit LPS und CD40L zu erhalten, wurden Expressionsanalysen mit dem Immuno/Onco Human cDNA-Array (PIQOR) durchgeführt. Da in Präparationen von einem Spender von epidermalen LC nicht die erforderliche Menge Gesamt-RNA (10 µg) gewonnen werden konnte, wurden die etablierten MoLC als Modellzelle eingesetzt. Von der MoLC-Population wurden zur besseren Vergleichbarkeit mit epidermalen LC nach der Generierung an Tag 6 die CD1c-positiven Zellen mit MACS aussortiert. Diese isolierten Zellen je eines Spenders wurden in zwei Ansätze aufgeteilt. Die MoLC im ersten Ansatz wurden mit Wt-Zellen inkubiert, die im zweiten Ansatz mit LPS (1 µg/ml) und CD40L<sup>+</sup>Zellen für 6 h stimuliert. Aus den lysierten Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert. In einem Kontrollansatz wurden 10<sup>5</sup> MoLC für weitere 12 h auf den CD40L<sup>+</sup>Zellen inkubiert, um danach mit CD83 im FACS die Stimulation der Zellen zu überprüfen. Da am Institut kein Genchip-Fluoreszenz-Scanner zur Verfügung stand, wurde die Analyse in Kooperation mit der Firma Memorec, Köln durchgeführt. Auf dem PIQOR Immuno-Onco Human Array sind cDNA von 642 Genen immunologisch relevanter Proteine in Doppelspots vorhanden.

##### 4.4.1 Qualitätskontrollen im Bioanalyser zeigen intakte RNA von CD1c<sup>+</sup>MoLC

Der PIQOR Genchip wurde mit amplifizierter RNA (aRNA) von MoLC hybridisiert, die aus Gesamt-RNA-Proben von einer *buffy coat*-Präparation generiert werden konnten. Die qualitativen Analysen der aRNA zeigten, dass die Nukleinsäuren 1, 2 und 4 intakt waren und keine Degradationserscheinungen aufwiesen (**Abb. 21**; Verhältnis der 28 S zur 18 S RNA Peakfläche >1,8). Da Probe 3 (CD1c<sup>-</sup>MoLC + CD40L) degradiert war, wurde Probe 2 (CD1c<sup>+</sup>MoLC + Wt) als RNA unstimulierter Zellen gegen Probe 4 (CD1c<sup>-</sup>MoLC + Wt) auf dem Mikroarray hybridisiert. Auf dem ersten Mikroarray wurde also eine Stimulation von CD1c<sup>+</sup>MoLC und auf dem zweiten Mikroarray wurden Unterschiede zwischen unstimulierten CD1c<sup>+</sup> und CD1c<sup>-</sup>MoLC analysiert.



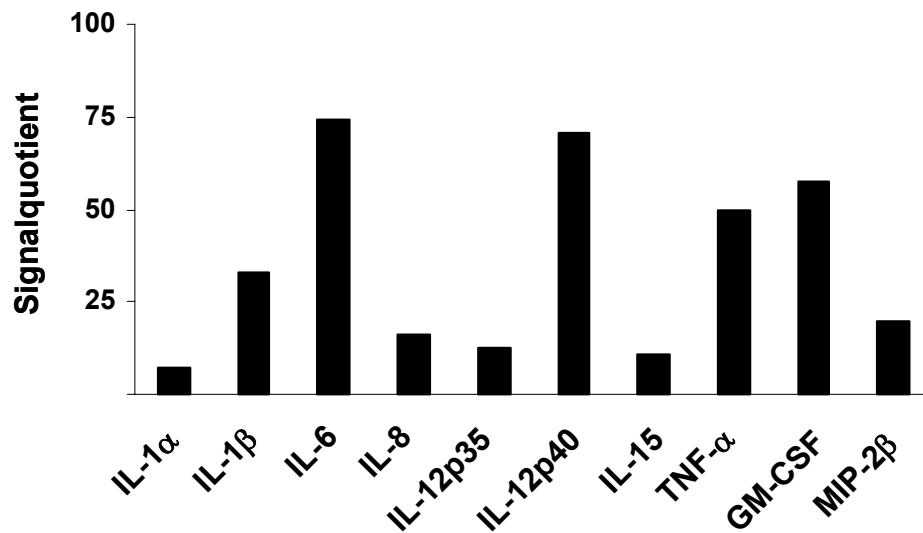
**Abb. 21: Qualitative Analyse der RNA von MoLC im Bioanalyser. (A)** Analyse der Gesamt-RNA für Chip 1 (Spur 1,2) und für Chip 2 (Spur 2, 4) im Elektropherogramm. Die obere Bande stellt die 28 S, die Bande darunter die 18 S rRNA und die unterste den internen Standard dar; Fragmentlänge der obersten Bande der Leiter 4 kB (Spur L). **(B, C)** Elutionsdiagramme der unstimulierten und der stimulierten RNA für Chip 1. Der mittlere Peak repräsentiert die 18 S, der rechte die 28 S rRNA, der linke Peak den internen Standard zur Quantifizierung.

#### 4.4.2 Auf dem Mikroarray werden 60 Gene in stimulierten MoLC als differenziell exprimiert nachgewiesen

Es wurde RNA von unstimulierten gegen RNA von stimulierten CD1c<sup>+</sup>MoLC auf Chip 1 und RNA von unstimulierten CD1c<sup>+</sup>MoLC gegen RNA von unstimulierten CD1c<sup>-</sup>MoLC auf Chip 2 hybridisiert. Da auf Chip 2 nur fünf Gene größer als 1,5-fach differenziell exprimiert wurden, konnten anders als bei den FACS-Analysen (**Abb. 19**) keine deutlichen Unterschiede zwischen MoLC, die über CD1c isoliert wurden, und der CD1c-negativen Fraktion gefunden werden. Bei Chip 1 wurden von den 642 auf dem Chip vorhandenen cDNA 60 Gene über Cy5 Rot-Fluoreszenz im Scanner als positiv differenziell exprimiert detektiert. Davon hatten 28 Doppelspots einen Variationskoeffizienten von  $C_V \leq 10\%$ . Die Werte der Signalquotienten sind Faktoren der Hochregulierung bzw. der Reprimierung eines Gens der stimulierten Probe gegenüber der unstimulierten Probe. Es sind quantitative Aussagen über die relative Genexpression. Bei insgesamt 32 Genen war über Cy3 Grün-Fluoreszenz eine Reprimierung der Expression (11 Doppelspots mit  $C_V \leq 10\%$ ) in der stimulierten Probe gegenüber der unstimulierten Probe zu detektieren (nicht gezeigt).

#### 4.4.2.1 Der Genchip detektiert eine Expression inflammatorischer Zytokine

In der Gruppe der Zytokine und Chemokine wurden die Gene für IL-6, IL-12p40, TNF- $\alpha$  und GM-CSF am stärksten hochreguliert (**Abb. 22**). Die Expression von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-6 und IL-8 bei stimulierten MoLC stimmte mit den Ergebnissen der Multiplex-PCR-Analysen von den cDNA epidermaler LC überein (**Abb. 7**). Insgesamt waren vor allem Gene für pro-inflammatorische Zytokine stimuliert, IL-10 und TGF- $\beta$  waren dagegen als anti-inflammatorische Zytokine nicht differenziell exprimiert. Damit zeigten die untersuchten MoLC einen aktivierten Status, wie er bei Entzündungsreaktionen vorkommt. Während GM-CSF-Expression bereits in der Multiplex-PCR detektiert worden war, überraschte in der PIQOR-Analyse die Detektion von IL-15 und MIP-2 $\beta$ .

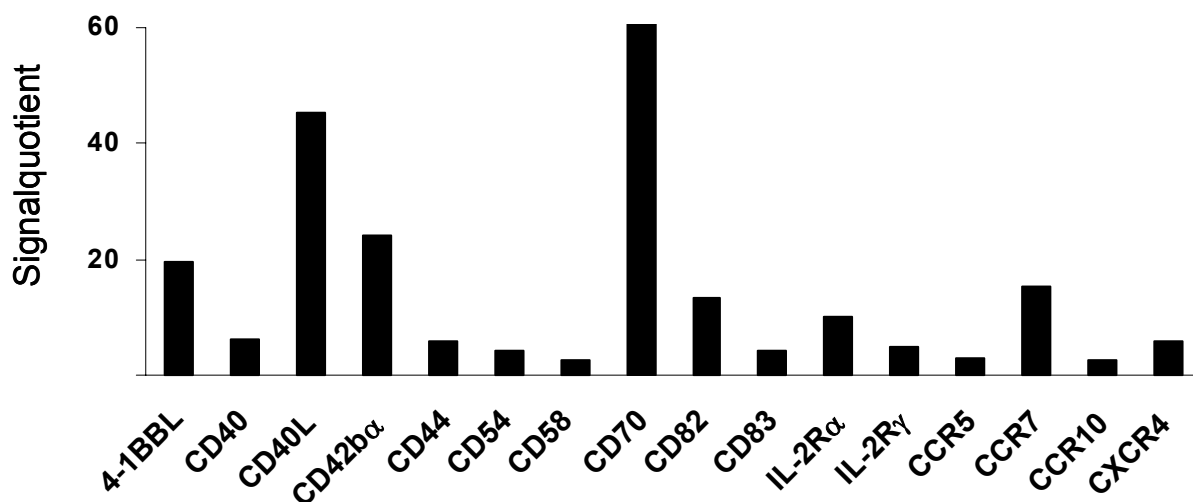


**Abb. 22: Mikroarray-Analyse von Zytokinen und von Chemokinen in MoLC.** Generierte CD1c<sup>+</sup>MoLC wurden an Tag 6 für 6 h mit CD40L<sup>+</sup>Zellen und 1  $\mu$ g/ml LPS stimuliert oder unstimuliert belassen. Nur die nicht-adhärenenten MoLC wurden danach von den Platten zurückgewonnen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Signalquotienten (Ratio Cy5/Cy3) differenziell exprimierter Gene von je zwei Spots. Es waren die cDNA für die Interleukine 1-18, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, - $\beta$ 3 und GM-CSF auf dem PIQOR-Array vertreten. Gezeigt sind Zytokingene, die gleiche oder 2-fach größere Signalintensitäten über dem Schwellenwert aus Heringssperma-RNA aufwiesen und die größer oder gleich 1,5-fach differenziell exprimiert wurden.

MIP-2 $\beta$ , auch als GRO $\gamma$  oder systematisch CXCL3 bezeichnet, wird hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten sezerniert. Expression von IL-15 war vorher in Monozyten (nicht gezeigt), aber nicht in epidermalen LC in der RT-PCR gefunden worden (**Abb. 8**).

#### 4.4.2.2 Der Genchip detektiert verstärkte Expression von kostimulatorischen Molekülen, Zytokin- und Chemokinrezeptoren

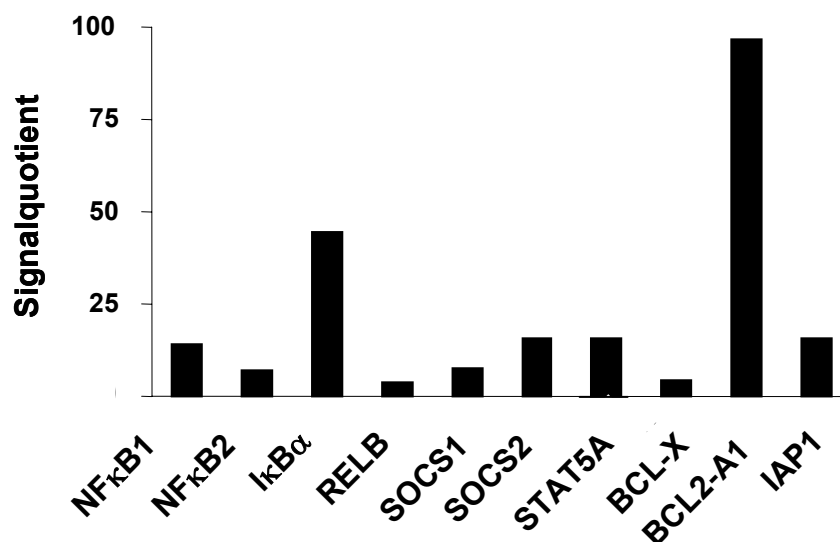
In der Gruppe der Oberflächenmoleküle wurden die kostimulatorischen Liganden CD40L, 4-1BBL und CD70 (CD27L) hochreguliert (**Abb. 23**). Interessanterweise wurden bei stimulierten MoLC vermehrt Transkripte für CD42b $\alpha$  (GPIb $\alpha$ ), CD82 (KAI1), die  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten des IL-2-Rezeptors und für die Chemokinrezeptoren CCR7 und CCR10 gefunden. In Übereinstimmung mit den Antigen-Analysen im FACS (**Abb. 19**) wurde auch Genexpression von CD54 und des Reifungsmarkers CD83 gemessen, nicht jedoch von CD80 und CD86.



**Abb. 23: Mikroarray-Analyse von Oberflächenmolekülen in MoLC.** Die Stimulation der MoLC erfolgte wie in vorherigen Experimenten für 6 h mit CD40L<sup>+</sup>Zellen und 1  $\mu$ g/ml LPS. Dargestellt sind die Mittelwerte der Signalquotienten differenziell exprimierter Gene von je zwei Spots. Auf dem Chip waren cDNA relevanter Antigene von CD1-CD97 vertreten. Gezeigt sind die Quotienten der Signalintensitäten (Ratio Cy5/Cy3) differenziell exprimierter Gene.

#### 4.4.2.3 Der Genchip detektiert verstärkte Expression von Molekülen der Zellaktivierung und der Apoptose-Inhibition

Überraschend war die Hochregulation von Genen für die zellaktivierenden Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B1, NF $\kappa$ B2 und RelB und von inhibitorischem  $\kappa$ B $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ ) zu einem Zeitpunkt (6 h, **Abb. 24**). Auch Gene, die mit unterdrückter Zytokinsekretion assoziiert sind (SOCS), und Gene für das zytosolische Protein STAT (Signaltransduktor und Aktivator der Transkription) 5A waren gegenüber den unstimulierten Proben hochreguliert. Mit *bcl-x*, *bcl-2* und *iap1* sind Gene der Inhibition von Apoptose-Prozessen exprimiert. Das Gen für Bcl2-A1 war neben dem für TPA (*tissue-type plasminogen activator*; nicht gezeigt) mit einem Signalquotienten von 97 das im Vergleich zu MoLC ohne Stimulus am stärksten hochregulierte Gen der Chip-Analysen.



**Abb. 24: Mikroarray-Analyse von Transkriptionsfaktoren, Signaltransduktions- und Apoptose-assoziierten Molekülen in MoLC.** CD1c<sup>+</sup> MoLC wurden wie vorher für 6 h stimuliert und von den Platten zurückgewonnen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Signalquotienten differenziell exprimierter Gene von je zwei Spots. Auf dem PIQOR-Array wurden über Hybridisierung an cDNA wichtige Transkriptionsfaktoren, Signaltransduktionsmoleküle und Apoptosegene untersucht.