

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Modulation und Migration der Langerhans Zellen in vitro und in vivo

Ortner, Ulrike

1994

I. Einleitung

I. Einleitung

1.) Das System der dendritischen Zellen

a) Entdeckung und Charakterisierung

Die dendritischen Zellen (DZ) sind ein, aus dem Knochenmark stammender Zelltyp, welcher zu den Antigenpräsentierenden - Zellen gehört (APZ) [1]. Erstmals wurden sie von Steinman und Cohn 1973 aus Mäusemilzen isoliert [2]. Ihren Namen verdanken sie ihrer äußerst charakteristischen Morphologie. Dieses verzweigte, dendritische Erscheinungsbild ist besonders deutlich bei den dendritischen Zellen der Epidermis, den Langerhanszellen [3] ausgeprägt. Nicht verwechselt werden dürfen sie mit den ebenfalls dendritisch aussehenden Melanozyten, welche sich in der Basalschicht der Epidermis befinden und neuroektodermalen Ursprungs sind, sowie den Merkel-Zellen, welche sich ebenfalls in der Basalschicht der Epidermis und auch in den epithelialen Haarwurzelscheiden befinden. In Abhängigkeit vom Mausstamm gibt es in der Epidermis noch Thy-1 positive DZ, bei denen es sich um T-Zellen handelt, die einen gamma/delta T-Zell-Rezeptor besitzen. Im Humansystem konnten nur sehr vereinzelt gamma/delta-positive Zellen dargestellt werden.

Die Identifikation der DZ erfolgt durch eine Kombination von morphologischen [12, 13], phänotypischen [5] und funktionellen [1,6,7] Merkmalen.

Während gewebeständige DZ Fortsätze mit rundem Querschnitt zeigen, welche Zellorganellen beinhalten, ist ihre Morphologie und ihr Verhalten in der Zellkultur einzigartig. Ihre dünnen, segelartigen Zytoplasmaausstülpungen (die sogenannten "veils") enthalten keine Organellen. Sie werden ständig ausgestülpt und wieder retrahiert. Weiters exprimieren die DZ typischerweise eine große Anzahl von MHC Klasse II-Molekülen sowie auch MHC Klasse I-Molekülen auf ihrer Zelloberfläche. Verschiedene Adhäsionsmoleküle, wie z.B. ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1, CD54) und LFA-3 (Leukocyte function associated antigen-3, CD58) sowie Moleküle mit kostimulatorischer Funktion bei der T-Zellaktivierung, wie z.B. B7/BB1 (CD80) werden exprimiert, während die typischen Makrophagenmarker (unspezifische Esterase, Oberflächen-ATPase, CD14, CD68, F4/80 Makrophagenmarker) nicht oder nur in sehr schwachem Maße vorkommen. Dieses Markerprofil weist auf die immunologische Aufgabe der DZ hin und es differenziert sie weitgehend vom

Monozyten/Makrophagen-System. Die DZ dienen als antigenpräsentierende Zellen für CD4⁺-Helfer T-Zellen und sind daher entscheidend wichtig zur Auslösung aller T-Zell-abhängigen Immunantworten, wie z.B. der (allergischen) Reaktion vom verzögerten Typ (Typ IV), der Abstoßung von Organtransplantaten und der Bildung von T-Zell-abhängigen Antikörpern. Weiters sind sie, nach dem bisherigen Wissensstand, die einzigen Zellen, die die Fähigkeit haben, naive, bisher nicht mit Antigen in Kontakt gelangte T-Zellen (ruhende T-Zellen) zu aktivieren, d.h. also eine primäre Immunantwort auszulösen. Vor allem dadurch unterscheiden sie sich markant von den als Prototyp der antigenpräsentierenden Zellen geltenden Makrophagen, aber auch von den B-Lymphozyten und den humanen venulären Endothelzellen, die in bestimmten Situationen ebenfalls als APZ dienen können. Diese Zellen können aber lediglich bereits sensibilisierte T-Zellen aktivieren, und spielen somit nur bei sekundären Immunantworten wichtige Rollen.

b) Vorkommen

Seit ihrer erstmaligen Beschreibung wurden die DZ in verschiedenen lymphatischen und nichtlymphatischen Geweben sowie im Blutkreislauf gefunden. Ihre Population macht in den meisten Fällen weniger als 1% der vorhandenen Zellen aus, was ihre Gewinnung und Charakterisierung aufwendig und schwierig macht.

***DZ in lymphatischen Organen:**

Im Lymphknoten befinden sich die DZ in den parakortikal gelegenen T-Zellarealen und werden dort als interdigitierende Retikulumzellen bezeichnet. In der Milz besiedeln sie die periarteriolären T-Zellareale [8, 9]. Auch im Thymus und den humanen Tonsillen konnten DZ definiert werden [9, 10].

***DZ im Blutkreislauf:**

Obwohl die Isolierung und Anreicherung (ursprünglich <0,1%) schwierig ist, stellt das Blut im Humansystem die Hauptquelle für die Gewinnung DZ dar. Sowohl im Blut [11, 12] als auch in der afferenten Lymphe [15, 16] kommen die DZ in Form von "veiled cells" vor, während die efferente Lymphe keine "veiled cells" enthält [1, 17].

***DZ in nicht-lymphatischen Organen:**

DZ, welche eine hohe Anzahl von MHC II-Molekülen exprimieren, wurden schon in vielen Organen gefunden, so z.B. in den Epithelien der Luftwege [18, 19], wobei sich die Zellen hier

phänotypisch und morphologisch von den Makrophagen unterscheiden und eine starke Aktivität zur T-Zell-Stimulation besitzen. Zellen gleichen Charakters wurden weiters im Interstitium des Herzens, des Darms, der Niere und der Leber [1] gefunden. Die in den Pankreasinseln vorzufindenden DZ sind für die Abstoßungsreaktion eines Pankreastransplantates verantwortlich. Dies wurde in einer experimentellen Transplantation von allogenen Inseln gezeigt [20]. Letztlich wurden DZ auch in der Haut, sowohl in der Epidermis [3, 5] als auch in der Dermis [3, 21, 22] charakterisiert. Der in der Epidermis gefundene DZ-Typ wird als Langerhans Zelle definiert und stellt die am besten charakterisierte, nichtlymphatische DZ dar.

c) Geschichte der Langerhans Zellen: Von der Nervenzelle zur immunkompetenten Zelle

Der Medizinstudent Paul Langerhans entdeckte 1868 in Berlin eine neue Population von intraepidermalen Zellen mit dendritischer Gestalt. Da sich in seinen mit Goldchlorid gefärbten Hautpräparaten die "Nervenfaser" (Dendriten) bis in die Dermis fortsetzten, schloß er daraus, daß es sich um Nervenzellen handeln müsse [11]. Viele Jahre lang wurden sie dann kaum beachtet, bis sie Anfang der 50er Jahre als Nervenzelle im Rahmen des neurohormonalen Systems von Wiedmann wieder auftauchten [23]. Später wurden die LZ als "verbrauchte" Melanozyten betrachtet.

Erst die Elektronenmikroskopie ermöglichte die Entdeckung einer spezifischen Zytoplasmaorganelle, des Birbeck-Granulums, wodurch die LZ endgültig als eigener Zelltyp definiert werden konnte. [24]. Das Auffinden dieser Birbeck-Granula in Histozyten im Rahmen der Histozytosis X bewies ihre mesenchymale Natur. Nach Auffindung von Oberflächenmolekülen, wie MHC II Molekül, Fc-Rezeptor und Komplementrezeptor, war ihre Natur als immunkompetente Zelle festgelegt. Knochenmarksstudien [25, 26] bestätigten die Herkunft der LZ aus dem Knochenmark und erlaubten somit die Klassifikation der LZ als Leukozyten. Die Bestimmung des Phänotyps gelang erst nach Etablierung der Methoden zur Produktion von monoklonalen Antikörpern [27].

K. Wolff stellte als erster epidermale Häutchenpräparate ("sheets") her, wodurch endlich eine quantitative Einschätzung der LZ-Verteilung möglich war. Somit entdeckte er, daß die Anzahl der LZ von Körperregion, Alter, Geschlecht und Haplotyp der Maus abhängig war und starken Schwankungen unterworfen war [21, 28].

Die ersten funktionellen Studien an LZ wurden von G. Stingl, S.I. Katz & Kollegen durchgeführt, wobei sie die LZ als Stimulator von proliferativen und zytotoxischen T-

Zellantworten erkannten [6, 29]. Die klassische Arbeit von Silberberg läßt vermuten, daß den LZ bei der Kontaktsensibilisierung eine wesentliche Bedeutung zukommt [30].

Aufgrund der Immunkompetenz und der Expression typischer Makrophagenmarker wie ATP-ase, unspezifische Esterase, Fc- und Komplementrezeptoren wurden die LZ primär dem Makrophagen/Monozyten-System zugerechnet [31]. Das Oberflächenantigen NLDC-145 oder auch das S100-Protein sowie die relativ schwache Phagozytosefähigkeit [11, 32] machten auf Dauer diese Hypothese unhaltbar. Die Experimente von Schuler & Steinman, die die LZ für kurze Zeit kultivierten, brachten die Erklärung, daß es sich bei LZ um unreife dendritische Zellen handeln müsse [7,33], denn in der Kultur (3 Tage) erfahren die LZ tiefgreifende morphologische, phänotypische und funktionelle Veränderungen, die sie zu typischen DZ heranreifen lassen. Während der 3-Tagekultur und in Anwesenheit von Keratinozyten oder von GM-CSF entwickeln die LZ die typischen, von den Milz-DZ her bekannten, beweglichen Zytoplasmaaustülpungen ("veils"). Außerdem verlieren sie (Maus) bzw. vermindern sie massiv (Mensch) die Birbeck- bzw LZ-Granula. Zusätzlich umfaßt die phänotypische Veränderung eine starke Zunahme der MHC-Moleküle [33, 34] auf der Zelloberfläche sowie einen Verlust bzw. starke Reduktion der Makrophagenmarker (Fc-Rezeptoren, F4/80 Makrophagen-spezifisches Antigen [35, 36], ATP-ase, unspezifische Esterase). Weiters vermehren sie an ihrer Oberfläche Adhäsionsmoleküle für die Kontaktaufnahme mit T-Zellen (ICAM-1 (CD54) [35-37], LFA-3 (CD58) [36], B7/BB1 (CD80) [38, 39, 40]) sowie auch MHC Klasse 1 Moleküle. Somit präsentieren kultivierte, epidermale LZ denselben Phänotyp wie DZ aus der Milz oder dem Blut [5, 7]. Diese Beobachtung gilt sowohl für das murine wie auch für das humane System.

Auch funktionelle Veränderungen finden während der Kultur von LZ statt. Während frisch isolierte LZ, die ein in vitro-Äquivalent der residenten LZ darstellen, schwache Stimulatoren für ruhende T-Zellen sind, können sie ihre stimulatorische Kapazität nach Kurzzeitkultivierung in Gegenwart von GM-CSF auf das 30- bis 100-fache steigern. Dieses Phänomen kann man in der MLR (mixed leukocyte reaction) aber auch in der polyklonalen T-Zell-Proliferation, die im Innsbrucker Labor in Form der Oxidativen Mitogenese (OXMI) getestet wird, beobachten. Nach Kurzzeitkultivierung sind die LZ also funktionell den aus der Milz gewonnen DZ gleichwertig [3, 34] und außerdem sind sie, im Gegensatz zu unreifen DZ, in der Lage, T-Zellen antigenunspezifisch zu binden ("clustering") [41, 42]. Während man früher dachte, daß die Stimulationszunahme von T-Zellen mit der Zunahme vom MHC-II Molekülen parallel lief, haben genauere Experimente gezeigt, daß die Zunahme von MHC-II Molekülen wesentlich früher einsetzt als die T-Zell-Stimulation [41]. Der Höhepunkt der T-

Zell-Stimulation ist am Tag 3 zu finden. Das Zytokin GM-CSF (Granulocyte/Macrophage-colony stimulating factor) scheint in diesem Reifungsprozeß die Hauptrolle zu spielen [43, 44].

Mit Hilfe von peptidspezifischen T-Zellhybridomen konnte gezeigt werden, daß frische LZ Proteinantigene sehr gut in immunogene Peptide proteolysieren („antigen processing“) und diese dann in ihren MHC-II-Molekülen binden können. Die sauren Zellorganellen, die in frisch isolierten LZ in großer Zahl vorhanden sind [45], sind wahrscheinlich für die Peptidverarbeitung verantwortlich. Da in dieser Phase ebenfalls die Biosynthese von MHC II-Molekülen stark läuft[46-48], scheinen gerade frisch isolierte LZ besonders gut für die Verarbeitung von Antigenen spezialisiert zu sein. Im Verlauf der Kultur verlieren sie die sauren Organellen [45], die MHC-Biosynthese [46] vermindert sich und sie verlieren die Fähigkeit Prozessieren von Proteinen. Peptide jedoch, die nicht prozessiert werden müssen, können auch noch von kultivierten LZ präsentiert werden [49].

Diese Studien haben also ergeben, daß kultivierte LZ praktisch identisch sind mit lymphoiden DZ, und daß die beiden essentiellen Eigenschaften zur Aktivierung von ruhenden T-Zellen, nämlich

- 1) die Bildung eines Liganden (d.h. des MHC/Antigen-Komplexes) für den antigen-spezifischen T-Zellrezeptor, und
- 2) die Sensibilisierung der T-Zellen (d.h. das antigenun-spezifische Binden der T-Zellen sowie die Bildung der notwendigen kostimulatorischen Signale) auf unterschiedlichen Stufen der Zelldifferenzierung vorkommen.

Frisch isolierte LZ sind also gute „Prozessierer“ und „Präsentierer“ von Antigenen aber schlechte Stimulatoren von ruhenden T-Zellen; kultivierte LZ zeigen ein umgekehrtes Verhalten. Eine wahrscheinliche Erklärung für diesen in vitro Reifungsprozeß gibt der Lebenszyklus: Eine noch unbekannte Vorläuferzelle aus dem Knochenmark wandert in die peripheren Gewebe aus (z.B. Epidermis) und verweilt dort in einem unreifen Stadium als residente LZ. Sie stellen also nun ein Reservoir von unreifen DZ dar, welche nach Antigenkontakt zur Migration stimuliert werden, entlang der afferenten Lymphbahnen wandern und in den lymphatischen Organen als reife DZ ankommen. Nachdem bisher noch keine DZ in den efferenten Lymphbahnen gefunden werden konnten, glaubt man nicht, daß die DZ zirkulieren, sondern daß die lymphatischen Organe die Endstation darstellen. Somit könnte also ein durch die Haut eingedrungenes Antigen von den unreifen LZ entgegengenommen und prozessiert werden und nach ihrer Reifung während der Wanderung eine spezifische T-Zellantwort in den lymphatischen Organen ausgelöst werden [1, 7, 50, 51,

52]. Dieser Prozeß ist deshalb sinnvoll, weil in den Geweben wie Epidermis, Dermis, Darmwand, Lungenepithel etc. die Anzahl der T-Lymphozyten relativ gering ist und somit nur ein geringe Chance bestünde, daß die antigenbeladene LZ den passenden antigenspezifischen T-Zellrezeptor findet.

Zusammenfassend kann man also sagen, daß in den nichtlymphatischen Organen, im Blut, in der afferenten Lymphe und in den lymphatischen Geweben DZ vorkommen, die alle ähnliche Eigenschaften besitzen und im Verlauf ihres Lebens einen ähnlichen Reifungsprozeß durchlaufen. Dies führte also dazu, die DZ als eine eigene Zellreihe zu klassifizieren [1, 53]. Nachdem es in jüngster Zeit gelungen ist, proliferierende DZ aus dem Blut [54, 55] und dem Knochenmark [56] zu züchten, ist es zunehmend wahrscheinlicher geworden, daß eine gemeinsame Vorläuferzelle von Monozyten und DZ existiert.

2.) Die Funktion der Langerhans Zelle während einer Immunantwort

1) Funktionelle Aspekte während der Induktionsphase

DZ sind hochspezialisiert auf eine primäre Immunantwort. Nach Steinman [1] werde ich die Mechanismen, die zu einer spezifischen Immunantwort führen, in drei Funktionen aufteilen:

- a) DZ als periphere Wachposten des Immunsystems;
 Prozessierung und Präsentation des Antigens („Wächterfunktion“, „sentinel function“)
- b) Die Migration aus der Peripherie ins lymphatische Gewebe sichert das Auffinden von antigenspezifischen T-Zellen („Migrationsfunktion“)
- c) LZ stimulieren ruhende T-Zellen („Adjuvansfunktion“)

ad a) LZ als periphere Wachposten des Immunsystems;

Prozessierung und Präsentation des Antigens:

Wie gezeigt wurde, können frisch isolierte LZ, also unreife DZ, lösliche Antigene sehr gut prozessieren. Die Bedeutung dieser Funktion kann gut am Modell der Kontaktallergie demonstriert werden. Durch die Applikation eines niedermolekularen Kontaktallergens (zB. DNCB, Oxazolon, Picrylsäure) in vivo, werden intraepidermale Proteine modifiziert und stellen somit ein Antigen dar [57]. Dieses nun "fremde" Protein wird von den LZ zu kurzen immunogenen Peptiden proteolysiert, welche dann in unbekannter Weise in die neu synthetisierten MHC-II-Moleküle eingepaßt und im weiteren auf der Zelloberfläche der LZ exprimiert werden [57, 58]. Es konnte gezeigt werden, daß LZ, die aus Hapten-behandelter Epidermis isoliert wurden, dieses Antigen in immunogener Form an der Oberfläche tragen: Sie können damit antigenspezifische T-Zellen stimulieren [59]

Auch nach Aerosolbehandlung mit Proteinen wurde das Protein als präsentiertes Antigen in der Lunge gefunden. Weiters erschien das Antigen auf DZ in den afferenten Lymphbahnen nach Injektion eines Proteins in die Dermis, und auch im Thymus konnten entsprechende peptidbeladene DZ nach i.v. Injektion von Protein gefunden werden [1]. DZ sind in Bezug auf diese Fähigkeit zur Aquisition und Verarbeitung von Antigen in vivo eindeutig besser als andere Zelltypen, wie Makrophagen oder B-Lymphozyten [60].

Wir wollen die Vorgänge an der Haut näher betrachten:

Es wurde beobachtet, daß nach epikutaner Applikation von Kontaktallergen haptensbeladene DZ in den regionalen Lymphknoten erschienen [61]. Hauser & Co. [62, 63] demonstrierten in vitro, daß LZ haptensisierte Antigene aufnehmen können, um sie dann ruhenden T-Zellen in hochimmunisierender Form zu präsentieren. Wenn man nun diese, durch LZ stimulierten T-Zellen, in normale Mäuse transferiert, können sie dort eine spezifische Kontaktsensibilisierung induzieren [62]. Trägt man aber ein Hapten auf Haut auf, deren LZ - Anzahl durch UV-Bestrahlung massiv vermindert wurde, so kann keine Kontaktsensibilisierung mehr erfolgen, sondern es kommt zur Toleranzentwicklung [64]. Somit scheint die Wachpostenfunktion der epidermalen LZ, zumindest was die Kontaktsensibilisierung betrifft, wahrscheinlich. Dermale DZ haben dabei eine unterstützende Funktion [65, 66].

Für den speziellen Fall der Nickelallergie konnte die Gruppe von Sinigaglia [67] zeigen, daß das Nickel-Ion an das Histidin prozessierter, dh. MHC-gebundener Peptide bindet. Dieselbe Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß der therapeutische Effekt von Gold bei der Behandlung der rheumatoiden Arthritis wahrscheinlich über einen ähnlichen Mechanismus funktioniert, indem sich das Gold an den MHC/Peptid-Komplex anlagert und dadurch die Präsentation des Selbstantigens an die spezifischen T-Zellen stört. Durch diesen, derartig veränderten, MHC/Peptid-Komplex kann aber die Proliferation von zytotoxischen T-Zellen generiert werden, was die Ursache der gefürchteten Komplikation, einer Typ IV-Reaktion gegen Gold, sein könnte.

Es besteht noch kein Konsens darüber, ob eine Prozessierung eines kleinmolekularen Haptens zur Auslösung einer spezifischen Immunantwort notwendig ist. Während die Arbeit von Romagnoli/Sinigaglia gegen die Notwendigkeit des Prozessierens spricht [67], weist der Bericht von Kolde eher schon darauf hin, da es nach seinen Untersuchungen nach Kontaktallergen-Applikation zu einer vermehrten endozytotischen Aktivität sowie zu einer vermehrten Ausbildung von LZ-Granula kommt [68].

Viel weniger weiß man über die Möglichkeit der Präsentation von Tumor- oder viralen Antigenen im MHC I-Molekül. Es wurde zwar die Fähigkeit von epidermalen LZ beschrieben, daß sie Allo-Antigene präsentieren könnten und somit eine allo-spezifische zytotoxische T-Zellantwort auslösen könnten [47], aber es gibt keine detaillierten Studien, welche die Antigenpräsentation im MHC I-Molekül von unreifen und reifen LZ vergleicht. Man fand lediglich, daß DZ aus lymphatischen Organen virale Antigene gut präsentieren und so die virus-spezifischen zytotoxischen Lymphozyten aktivieren können. Dieser Mechanismus wurde bei Herpes simplex, Influenza, Moloneyleukämie und Sendai gezeigt [1]. Ebenso gibt

es Hinweise darauf, daß LZ Tumorgewebe in immunogener Weise prozessieren können [69, 70]. Auch weiß man wenig über den Einfluß von Zytokinen auf die LZ-Funktionen dieser Entwicklungsstufe. Es wäre jedoch ein Einfluß der Zytokine TNF- α (Tumor Nekrose Faktor-alpha), Interferon-gamma und Interleukin 4 zu erwarten, da sie einen Einfluß auf die Biosynthese der MHC Moleküle haben [71-74].

Einige Experimente weisen aber eher auf eine hemmende Rolle des TNF- α bei der Antigenpräsentation hin. Wie schon erwähnt, prozessieren frisch isolierte, hoch angereicherte LZ lösliches Proteinantigen und präsentieren es als immunogenen Peptid/MHC-Komplex auf ihrer Oberfläche. Wenn während der 3d dauernden Kultur die Gegenwart von keratinozytenkonditionierten Medium oder von GM-CSF gewährleistet ist, dann können die LZ am d3 ein spezifisches T-Zell-Hybridom stimulieren, und zwar mit den Peptid/MHC Komplexen, die sie 3d zuvor generiert haben. Werden frische LZ dagegen mit TNF- α kultiviert, so prozessieren sie natives Protein mit unverminderter Effizienz, aber es kommt am d3 zu keiner Stimulation des Hybridoms. Exogen zugeführtes Peptid wird ausgezeichnet präsentiert. Es scheint also, als ob TNF- α zu einem Verlust von immunogenen Peptiden führte [75].

ad b) Die Migration aus der Peripherie ins lymphatische Gewebe sichert das Auffinden von antigenspezifischen T-Zellen.

Üblicherweise treffen Antigene primär auf Oberflächenepithelien. Somit liegen also die unreifen DZ in der Epidermis strategisch günstig, um Antigene aufzunehmen und zu prozessieren, wie oben beschrieben wurde. Nachdem sich in der Haut relativ wenig T-Lymphozyten befinden, erscheint es sinnvoll, daß antigenbeladene LZ die Epidermis verlassen und über die afferenten Lymphgefäße in die parakortikalen T-Zellareale der Lymphknoten auswandern. Diese Erkenntnis stammt aus relativ frühen Hauttransplantationsstudien [77] und Kontaktsensibilisierungsstudien [78], die gezeigt haben, daß die afferenten Lymphgefäße intakt sein müssen, um eine immunologische Reaktion zu erhalten. Am Anschaulichsten wurde diese Migrationsfähigkeit von peripheren Organen zu Lymphorganen durch die Transplantation von Herzen gezeigt, wobei DZ des Transplantates in die Milz wanderten und dort auch nachgewiesen werden konnten [79].

Nach bisherigem Verständnis wird also auch nach Applikation eines Antigens auf die Haut, dieses Antigen prozessiert und über die abfließenden Lymphwege als immunologisch wirksamer MHC/Peptid- oder MHC/Peptid/Hapten-Komplex abtransportiert. Es gibt einige Studien, die diesen Effekt (meist indirekt) zeigen:

1. Nach Applikation von Kontaktallergenen kommt es in der Epidermis zur Abnahme der LZ-Zahl um ungefähr ein Drittel [2, 80, 81].
2. Larsen & Co. [82] studierten die Wanderungsfähigkeit direkt. Sie konnten in einem Organkulturmodell zeigen, daß die Anzahl der LZ in der Epidermis sich vermindert, während die MHC-Klasse II-positiven Zellen in der darunterliegenden Dermis sich vermehren. Viele dieser stark MHC-Klasse II-positiven dermalen Zellen scheinen sich in Gefäßen (eventuell Lymphgefäße) zu sammeln (cords). Nach drei Tagen konnte er typisch aussehende DZ finden, die aus dem Organ in das Medium gewandert waren. Die Beobachtungen im Humansystem waren ähnlich [22].
Aufgrund dieser Ergebnisse übernahm ich dieses Organkultursystem für meine weiteren Studien (siehe später).
3. Untersucht man die abfließenden Lymphgefäße und die regionären Lymphknoten nach epikutaner Kontaktsensibilisierung, so erkennt man eine Zunahme von DZ, die teilweise auch die für die LZ typischen Birbeckgranula enthalten [30, 61, 83].
4. Nachdem Kimber & Co. das Kontakallergen Fluorescein-Isothiocyant auf die Flanken von Mäusen applizierte, konnten sie eine massive Zunahme von DZ, die zum Teil Birbeckgranula enthielten, in den Lymphknoten finden, die fähig waren, FITC-spezifische T-Zellen zu stimulieren [84]. Dieselben Ergebnisse konnten nach Applikation von Dinitrochlorobenzol gefunden werden [21].
5. Kripke & Co. [85] transplantierten allogene Haut. Sie applizierten Kontaktallergen auf das Transplantat und sahen, daß es möglich war, mit DZ aus den Lymphknoten von Transplantationsmäusen, gesunde Mäuse zu sensibilisieren.
6. Die Mechanismen, welche zu dieser Migration führen, sind bis heute unbekannt. Verschiedene Adhäsionsmoleküle (ICAM-1/CD 54, LFA-3/CD 58), die auf den heranreifenden LZ vermehrt ausgebildet werden, dürften dabei eine Rolle spielen [86-89]. Umgekehrt könnte auch das E-Cadherin-Molekül eine wichtige Rolle spielen. Es wird auf heranreifenden LZ herabreguliert [90]. Wieweit Zytokine dafür verantwortlich gemacht werden können, ist noch weitgehend unklar. Es gibt jedoch einige Hinweise, daß TNF- α diesbezüglich eine wichtige Rolle spielen könnte.
 - a) Vermeer & Streilein [91] fanden nach intradermaler Injektion von TNF- α eine Abnahme

der LZ in den anschließend angefertigten Epidermal“sheets“.

b) Cumberbatch & Kimber injizierten Mäusen TNF- α intradermal und konnten anschließend eine Akkumulation von DZ in den Lymphknoten [92] feststellen und eine Abnahme von LZ in der Epidermis [93]. Nur muriner rekombinanter TNF- α war imstande eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der DZ-Anzahl in den regionären Lymphknoten zu verursachen, während muriner rekombinanter GM-CSF und auch hitzeinaktivierter muriner TNF- α unter denselben Bedingungen ohne Wirkung blieben. Auch der ebenso verwendete humane TNF- α konnte keine ähnlichen Ergebnisse liefern. Zusätzliche Hinweise ergab die PCR-Analyse der epidermalen Zytokinproduktion unter verschiedenen Bedingungen: Es kam zu einem Anstieg der Zytokine TNF- α und GM-CSF in der Epidermis nach Applikation von Irritantien und sensibilisierenden Substanzen. Die sensibilisierenden Substanzen führten, genauer gesagt, zu einer Erhöhung der m-RNA für Interleukin-1 α , IL-1 β , Interferon-induziertes Protein 10 (IP-10) und Makrophagen-inflammatorisches Protein 2 (MIP-2) [94, 95].

ad c) LZ binden ruhende T-Zellen und aktivieren deren Proliferation

Die antigenbeladenen DZ müssen in die regionären Lymphorgane wandern, damit sie überhaupt die Gelegenheit haben, für ihre MHC/Peptide bzw. MHC/Peptid/Hapten-Komplexe, spezifische T-Zellklone zu finden. Sind die T-Zellen stimuliert, proliferieren sie und produzieren Zytokine. Die Aktivierung der passenden T-Zellen erfolgt in drei Schritten [52]:

- 1) Reife DZ, wie wir sie nach der Migration in die Lymphknoten vorfinden, sind fähig, ruhende T-Zellen in einer antigenunabhängigen Weise in relativ stabilen aber reversiblen Aggregaten zu binden [41, 42, 96]. Wahrscheinlich kann auf diese Weise aus einem großen Angebot von T-Zellen die passende T-Zelle herausgefunden werden. Das Phänomen der Bildung von großen Zellaggregaten ("cluster"-Bildung) kann im Phasenkontrastmikroskop gut beobachtet werden. Bis dato sind die molekularbiologischen Mechanismen für dieses Phänomen nicht bekannt. Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß die im Zuge des Reifungsprozesses der LZ an deren Oberfläche zur Expression kommenden Adhäsionsmoleküle dafür mitverantwortlich sind. Das antigenunspezifische "clustering"

kann nur bei reifen DZ, wie z.B. bei kultivierten LZ [13, 35, 36, 40], und nicht bei anderen APZ beobachtet werden.

- 2) Als nächster Schritt erfolgt die antigenspezifische Bindung zwischen DZ und T-Zelle, also die Bindung des MHC-Antigenkomplexes an den passenden T-Zell-Rezeptor.

Biochemische und molekularbiologische Studien zeigen, daß APZ nur eine geringe Anzahl von streng definierten immunologisch wirksamen Peptiden präsentieren und zusätzlich eine große Zahl Peptide von größerer Variationsbreite [12, 97]. Eine APZ, insbesondere eine DZ kann also eine sehr große Zahl von verschiedenen Peptiden präsentieren.

Wahrscheinlich werden sehr wenige identische MHC-Peptidkomplexe benötigt (wenige 100), um ruhende T-Zellen zu stimulieren. Das anti-CD3-Mitogenese-Modellsystem [98] und andere Studien [99] weisen auf die Notwendigkeit einer geringen Anzahl hin [68].

- 3) Für die T-Zell-Proliferation sind weiterhin noch kostimulatorische Signale nötig, welche von DZ gebildet werden [100]. Diese Signale sind aber biochemisch noch nicht vollständig identifiziert [101], lediglich für das B7/BB1 (CD80)-Molekül, welches auf reifen DZ exprimiert wird [38, 39, 40], wurde eine kostimulatorische Funktion nachgewiesen [102-104].

Für diesen, oben beschriebenen, Reifungsprozeß, wird vor allem das Zytokin GM-CSF verantwortlich gemacht [105, 106]. Auch das Zytokin IL-1 α zeigte einen positiven Effekt nach Zugabe zu, in GM-CSF kultivierten, LZ, indem die stimulatorische Kapazität nochmals um das Zweifache anstieg [44]. Im Gegensatz dazu kann TNF- α die LZ in Kultur zwar durchaus viabel erhalten, induziert aber nur eine unvollkommene Reifung, sodaß, mit TNF- α kultivierte, LZ schwache Stimulatoren von ruhenden T-Zellen bleiben [76]. Koch & Kämpgen konnten zeigen, daß bereits prozessiertes Antigen unter dem Einfluß von TNF- α seine immunogene Form in der MHC-Peptidbindungsgrube verliert, und somit TNF- α , in gewisser Weise, eine immunsuppressive Wirkung hat [75].

2.) Funktionelle Aspekte während der Elizitationsphase

(Die kutane Immunantwort bei nochmaligen Antigenkontakt)

In der Induktionsphase erfolgte eine Aktivierung des Immunsystems:

- 1) Nach Aktivierung der T-Zellen im Lymphknoten kommt es zu einer massiven Proliferation von T-Blasten, die dann in großer Anzahl über die efferente Lymphe und den Ductus thoracicus ins Blut gelangen.
- 2) Die T-Blasten exprimieren jetzt weniger "Homingreceptoren" für HEV (high endothelial venules), sodaß sie nicht mehr ständig durch den Lymphknoten zirkulieren bzw. dort zurückgehalten werden. Es wird vermehrt CLA-Antigen, welches vom monoklonalen Antikörper HECA-452 erkannt wird [107], exprimiert, welches sich als passender Ligand an das ELAM-1-Molekül bindet, das vor allem in Hautgefäßen zu finden ist [88, 108, 109]. Somit können aktivierte T-Zellen selektiv in der Haut akkumulieren. In anderen Geweben wirken andere gewebs-/organspezifische Adhäsionsmoleküle.

Bei wiederholtem Allergenkontakt kommt es in der Haut zu einer lokalen Extravasation und Akkumulation von Entzündungszellen. Neben einer erhöhten Zytokinproduktion durch die Keratinozyten, die unter anderem eine chemotaktische und aktivierende Wirkung auf Entzündungszellen hat, kommt es auch zu einer verstärkten Expression von ICAM-1 auf Keratinozyten, welche zu einer intraepidermalen Akkumulation von LFA-positiven Leukozyten führt [110]. Andererseits wird durch das Allergen vermehrt ELAM-1 an den Hautgefäßen exprimiert, wodurch es zu einer verstärkten Ansammlung von T-Blasten im Entzündungsareal kommt. Die schon in großer Zahl vorhandenen, also präformierten, T-Blasten werden erneut zur Proliferation stimuliert, wobei diese Proliferation nicht nur von antigenpräsentierenden DZ aktiviert werden kann, sondern von sämtlichen anderen MHC-II-positiven APZ, wie z.B. Makrophagen oder unreifen LZ [111]. Dadurch kommt es zu einer wesentlich massiveren T-Blasten-Proliferation als bei der Primärantwort, bei der ja nur die ruhenden T-Zellen durch die antigenpräsentierenden, reifen DZ aktiviert werden. Stimulierte T-Blasten produzieren wiederum chemotaktisch wirksame Zytokine (Interferon gamma, TNF- β , Interleukin 2), die weitere Entzündungszellen aktivieren. Durch diese überschießende Reaktion kommt es z.B. zum klinischen Bild einer Kontaktdermatitis.

3. Fragestellung

Das System der DZ, ihre Reifung, und ihre Funktion innerhalb des Immunsystems wurde, wie oben beschrieben, schon von vielen Seiten untersucht und dokumentiert. Trotzdem gibt es noch zahlreiche Lücken und offene Fragen, sodaß die DZ wohl noch lange Zeit ein zentraler Punkt im wissenschaftlichen Interesse bleiben wird. Ich konzentrierte mich in meinen Studien weitgehend auf das Phänomen der Migration und deren mögliche Auslöser:

- 1) Primär erfolgte die Auslotung eines Organkultursystems, das teilweise von Larsen [82] übernommen wurde, und dessen Modifikation bzw. Verfeinerung von mir vorgenommen wurde. Weiters folgten Versuche zur Darstellung der Migration der LZ in den Lymphgefäßen in Form von Färbeexperimenten und zur Kinetik der DZ-Reifung in der Kultur.
- 2) Welche Zytokine und andere Faktoren könnten für die Migration der LZ aus der Epidermis bzw. Dermis in das Medium verantwortlich sein? Hier versuchte ich einerseits durch Zugabe verschiedener Zytokine die Migration zu verstärken, andererseits, mit Hilfe von Antizytokinen, eine Hemmung der Migration zu erreichen. Durch Veränderung verschiedener Faktoren (Ablagezeit, serumfreies Medium, unterschiedliche Mausstämme, wie vor allem LPS-resistente C3H-Mäuse) sollten zur Aufklärung der Migrationsfaktoren führen.
- 3) Einige Untersuchungen wiesen darauf hin, daß TNF- α ein möglicher Faktor für die Migration wäre. Mit Hilfe eines Bioassays versuchte ich, TNF- α in den Kulturen zu messen.
- 4) Sekretoneurin, ein neues Neuropeptid [100], wurde als Migrationsstimulator für Monozyten aus dem Blut in die Peripherie entdeckt und postuliert [101]. Somit könnte es auch eine Wirkung auf die LZ-Migration haben und wurde somit im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Pharmakologie ausgetestet.