

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Charakteristische Aspekte des Migrationsverhaltens kutaner dendritischer Zellen im Humansystem

Lukas, Michael Alexander

1996

I. Einleitung

[urn:nbn:at:at-ubi:2-12531](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:at:at-ubi:2-12531)

I. EINLEITUNG

A. DIE HAUT ALS IMMUNORGAN

Während in der Vergangenheit das Hautorgan vorwiegend als Ziel immunologischer Reaktionen gesehen wurde, haben Fortschritte der Grundlagenforschung gezeigt, daß die Haut, vor allem aber die Epidermis, Initiator einer Immunantwort sein kann.

Trotz ihres einfachen und uniformen histomorphologischen Aufbaus ist die Epidermis ein hochkomplexes Organ, das neben Keratinozyten und Melanozyten Zellpopulationen enthält, welche aus dem Knochenmark stammen. Sie enthält Antigen-präsentierende "Langerhanszellen", produziert eine Reihe immunmodulatorischer Zytokine und enthält eine, vorderhand nur im murinen System nachgewiesene, distinkte T-Zellpopulation (1-6).

Sowohl stimulierende als auch unterdrückende Signale, die entweder zu Sensibilisierung oder Immuntoleranz führen, entstehen nach Antigenexposition in der Epidermis selbst und gehen von distinkten Zellsystemen aus. Während sensibilisierende und tolerogene Signale unter den üblichen Bedingungen derart gewichtet sind, daß "Langerhanszell-medierte" Sensibilisierung überwiegt, führt eine Unterdrückung der Langerhanszellfunktion zu einem Überwiegen des suppressorischen Regelkreises (7).

Die strukturelle und antigene Ähnlichkeit zwischen Epidermis und Thymus, die Sekretion regulatorischer Zytokine durch Keratinozyten, die Wanderung von Lymphozyten in die Epidermis (wie dies bei bestimmten Hauterkrankungen der Fall ist), sowie die Art der T-Zellrezeptor-Expression (gamma/delta T-Zellrezeptor) auf (murinen) dendritischen epidermalen T-Zellen (DETC), sog. "Thy-1 + Zellen" läßt vermuten, daß die Epidermis Ort postthymischer oder extrathymischer Reifung sein könnte (4,8).

Welche Bedeutung der Dermis in diesem komplexen System zukommt, ist noch unklar. Auch über das System "Dermaler Dendritischer Zellen" ist noch relativ wenig bekannt (9).

B. LANGERHANSZELLEN

1. Geschichtlicher Rückblick

Entdecker und Namensgeber dieser Zellen war *Paul Langerhans*, der 1868, noch während seiner Zeit als Medizinstudent in Berlin in der suprabasalen Schicht Goldchlorid-impregnierter humaner Epidermis stark verzweigte (dendritische) Zellen entdeckte (10). Er hielt diese für *Nervenzellen*. Auch andere Autoren verfolgten dieselbe Theorie und sprachen von einem *intraepidermalen Nervensystem*.

Erst in den 50iger und 60iger Jahren unseres Jahrhunderts trat eine Änderung der Sichtweise ein. So etwa verfolgte Masson eine Theorie, wonach es sich bei LC um *sterbende Melanozyten* handeln sollte.

Daß dem nicht so war, vermochte 1961 die Gruppe um Birbeck zu zeigen (11). Anhand elektronenmikroskopischer Methoden konnte neues Wissen akkumuliert werden. Mit Entdeckung der sogenannten "Birbeck-Granula" sollte zudem ein essentielles Kriterium für die zukünftige Identifikation von LC zur Verfügung stehen.

Die Arbeiten von Basset et al. bekräftigten die Theorie der mesenchymalen Herkunft der LC.

Als schließlich erkannt wurde, daß sich auf der Oberfläche von LC Komplement-Rezeptoren (12,13) sowie MHC Klasse II Moleküle befinden und die Herkunft der LC aus dem Knochenmark eindeutig gezeigt worden war, begann eine neue Ära, die immer deutlicher die Einbindung der LC in *immunologische Funktionen* erkennen ließ.

Bald darauf war es evident, daß LC *potente Stimulatoren antigen-spezifischer proliferativer und zytotoxischer Immunantworten* sind (14-18).

Somit war am Ende aus der vermeintlichen Nervenzelle eine potente immunstimulatorische Zelle geworden. Details in (19).

2. Vorkommen, Dichte

LC kommen sowohl in der Haut als auch in anderen geschichteten Plattenepithelien von Säugern vor. In der menschlichen Epidermis nehmen sie eine *basale bis suprabasale* Position ein und sind in einer Dichte von 460 - 1000 Zellen per mm² vertreten. Obgleich sie zahlenmäßig nur 1-3% aller epidermalen Zellen ausmachen, so sind sie doch aufgrund ihrer langen Fortsätze (Dendriten) in der Lage, die gesamte Epidermis netzförmig zu überspannen.

3. Phänotypische und funktionelle Marker

Die wichtigsten Marker, mittels derer sich LC histo-, bzw. immunhistochemisch nachweisen lassen, sind: (1) *common leukocyte antigen CLA* = T 200 = CD45, (2) Fc IgG-Rezeptoren = CD32, (3) Rezeptoren für bestimmte Komplement-Komponenten = CD11b, (4) CD 1a Antigen, (5) CD4 Antigen (nur human), (6) MHC Klasse I, (7) MHC Klasse II, (8) Adenosintriphosphatase, (9) S-100 Protein sowie (10) Birbeck - Granula.

Von Bedeutung sind hier das CD1a Antigen, von dem man ursprünglich geglaubt hatte, daß es ausschließlich und selektiv auf Thymozyten exprimiert würde. Spezifisch für LC in der epidermalen Umgebung sind von den aufgeführten Markern (2), (3), (4), (7), (8) und (10). Die in der Praxis gebräuchlichsten Moleküle zur Identifikation humaner epidermalen LC sind CD1a und MHC Klasse II.

Aus funktionellen Gründen besonders wichtig ist die Expression von Allo-Antigenen, die durch den MHC kodiert werden. So sind LC die einzigen Epidermalzellen, welche unter Normalbedingungen, d. h. in normaler, nicht stimulierter oder pathologisch veränderter Epidermis MHC Klasse II Allo-Antigen synthetisieren und exprimieren (20,21). Beim Menschen erfolgt die Kodierung durch die HLA-DR/DP/DQ Loci. Hier sei zudem darauf hingewiesen, daß der Phänotyp der LC nicht eine stabile Eigenschaft darstellt, sondern vom Reife-, und Differenzierungsgrad dieser Zellen abhängt (siehe auch später).

4. Herkunft, Einordnung

LC stammen aus dem Knochenmark (siehe später) und sind Teil des "Systems Dendritischer Zellen". Trotz eindeutiger Abgrenzung zum "System der Monozyten und Makrophagen" weisen residente LC auch Eigenschaften mononukleärer Phagozyten auf, wie etwa Fc IgG-, oder Komplementrezeptoren, ATPase und Esterase-Aktivitäten auf. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde anfänglich über eine ontogenetische Brücke zwischen dem System der Mononukleären Phagozyten und jenem der Dendritischen Zellen spekuliert. Diese Einschätzung ist aber nach heutigem Wissen nicht haltbar.

C. DAS SYSTEM DENDRITISCHER ZELLEN

Dendritische Zellen bilden ein komplexes System weitläufig verteilter Antigen-präsentierender Zellen, welche dazu spezialisiert sind, primäre Immunantworten zu initiieren (22).

1. Die Dendritische Zellreihe

DC entstehen im Knochenmark aus hämatopoetischen Vorläuferzellen. Daß solche Präkursoren existieren ist bekannt (23-27). Ihre Zellreihe innerhalb der myeloiden, ist eine eigenständige. Inaba und Schuler vermochten zu zeigen, daß *Mausblut* Progenitoren enthält, aus welchen sich unter dem Einfluß von GM-

CSF große Mengen von DC züchten ließen (28). Eine derartige Induktion dendritischen Zellwachstums gelang zudem aus Präkursoren des *murinen Knochenmarks*. Auch in diesem Fall erwies sich GM-CSF dafür als essentiell (29). Ähnliche Befunde erhielt man für das *Humansystem*. Um aus CD34+ Progenitoren DC zu generieren, bedurfte es der Kombination von GM-CSF und TNF-alpha (30). Dieses Vorgehen erwies sich auch für Versuche mit *humanem Nabelschnurblut* als erfolgreich. Um aus Progenitoren des *peripheren menschlichen Blutes* größere Mengen von DC zu gewinnen, war jedoch außerdem IL-4 notwendig (31).

Trotz gewisser Teilerfolge gelang es bis dato nicht, eine Progenitorzelle für jene putative dendritische Zelllinie zu isolieren und genau zu charakterisieren.

2. Charakteristika

DC weisen eine Reihe von spezifischen Merkmalen auf, welche eine deutliche Abgrenzung zum System der Monozyten und Makrophagen ermöglichen. Diese Eigenschaften sind jedoch nicht konstant, sondern verändern sich im Zuge der Reifung von DC (siehe dort).

(1) Während in Geweben *residierende* DC, wie beispielsweise LC in der Epidermis, multiple Fortsätze (Dendriten) aufweisen, die im Querschnitt rund erscheinen und welche Zellorganellen beinhalten, entwickeln *kultivierte* DC dünne, segelartige Zytoplasma-Fortsätze, sogenannte "veils" (engl.). Diese sind typischerweise frei von jeglichen Organellen und werden außerdem permanent aktiv ausgestreckt und wieder retrahiert. Ein Verhalten, das bei keinem anderen Leukozytentyp beobachtbar ist (32,33).

(2) Eine weitere Eigenschaft, welche auf residente oder frisch isolierte, insbesondere aber auf kultivierte LC zutrifft, ist die Expression von MHC Klasse II Molekülen auf der Zelloberfläche (34).

(3) Hingegen mangelt es den DC an hoher Expression typischer Marker der Monozyten/Makrophagen-Linie (z.B. CD14, CD68).

(4) Gleichfalls relativ geringfügig ausgeprägt ist die phagozytotische Potenz, sowohl frisch isolierter als auch kultivierter LC (32,35).

(5) DC spielen eine entscheidende Rolle bei der Auslösung primärer, T-Zell medierter Immunität. In Abhängigkeit ihres Reifezustandes (siehe dort) sind sie entweder exzellente Antigen-Prozessoren oder aber - mit bereits prozessiertem Antigen - potente Stimulatoren ruhender, naiver T-Lymphozyten (22,36).

3. Vorkommen

DC okkupieren 3 Kompartimente des Organismus:

(a) Nicht lymphatische Organe

In der *Haut* kommen DC sowohl in der Epidermis i.e. LC (32,34) als auch in der Dermis (9,32,37-39) vor. Nicht zuletzt aufgrund ihrer relativ einfachen experimentellen Verfügbarkeit wurden die epidermalen LC rasch zum Paradebeispiel einer, im nicht lymphatischen Gewebe residenten DC.

Auch in den *Atemwegen*, insbesondere in den Epithelien und Alveolarsepten (40-45) fand man DC, welchen, so wie den DC der lymphatischen Organe eine sehr starke T-Zell stimulatorische Aktivität eigen war.

Fabre, Hart und McKenzie konnten zeigen, daß das Interstitium *vieler Organe* mit Ausnahme des Gehirns stark MHC Klasse II sowie CD45 positive DC enthält (46). Larsen et al. lieferten im Rahmen von Herz-

Transplantationen im murinen System Hinweise auf die Migration DC aus dem Spenderherzen in die Empfänger milz (47). Die DC im Herz wurden mittlerweile charakterisiert (48).

In der *Leber* entdeckte man DC *in situ* vor allem im Bereich der Portalfelder (vgl. im Gegensatz dazu Kupffer'sche Zellen entlang der Sinus) (49). Diese DC wurden erst kürzlich isoliert (50). Gleiches gilt für DC aus der Niere (48).

DC der *Pankreasinseln* werden für Transplantatabstoßungsreaktionen in experimentellen Ansätzen verantwortlich gemacht (51) und auch der *Darm* enthält DC, vorwiegend in der Lamina propria gelegen (52,53).

(b) Zirkulation

Afferente Lymphe enthält DC mit besonders ausgeprägten "veils" (23,54-58). Weniger als 0.1% aller, im *Blut* zirkulierenden Leukozyten sind DC. Es handelt sich dabei vermutlich um solche DC, welche aus dem Knochenmark kommend, in die nicht lymphatischen Gewebe unterwegs sind. Diese DC konnten mit diversen, in der Regel langwierigen Techniken aus dem Blut isoliert, angereichert und charakterisiert werden (59-63).

(c) Lymphatische Gewebe

Hier erstreckt sich das Vorkommen DC neben dem *Thymusmark* (27,64) v.a. auf die *T-Areale der peripheren lymphatischen Organe*. Hier wurden sogenannte "Interdigitierende Zellen" beschrieben, welche sowohl zytologisch als auch phänotypisch den DC entsprechen (65,66). Austyn et al. bemerkten eine spezifische Ansiedelung ("homing") experimentell peripher applizierter DC (67), wobei über die Effizienz dieses "homings" allerdings noch wenig bekannt ist. Möglicherweise werden nur jene DC aufgefangen, welche eine, zu ihrem "zur Schau getragenen Antigen" spezifisch passende T-Zelle finden. Obgleich der Flux von DC bis zu 10^5 Zellen pro Stunde betragen kann, konnte bisher noch keine Akkumulation DC im Lymphknoten oder in der efferenten Lymphe gefunden werden. Bezugnehmend auf den substantiellen "turn-over" in Lymphe und Milz (23,24) dürften die meisten DC nach Erreichen des lymphatischen Organs durch Apoptose zugrunde gehen. DC aus der Milz stellen die bestuntersuchte Population einer im lymphatischen Gewebe residierenden DC dar. Seit ihrer Entdeckung durch Steinman und Cohn (68,69) wurden die Methoden der Isolation und Anreicherung ständig verbessert (70-72). Beim Sortieren von DC aus frischen Milzsuspensionen zeigte sich, daß sich lediglich eine Subpopulation klar mit dem mAK NLDC145 immunhistochemisch anfärben ließ, einem gegen die interdigitierenden Zellen der zentralen periarteriolen Lymphscheide gerichteten Antikörper (73,74). Im Schnitt entdeckte man Nester von DC in der Peripherie der T-Areale (75,76). Dies zeigt, daß DC wie Türen positioniert sind, durch welche die T-Zellen den arteriellen Schenkel in der Marginalzone verlassen. Möglicherweise enthalten die lymphatischen Organe 2 Populationen von DC, eine "periphere" kurzlebige, sowie eine "zentrale" langlebige aus interdigitierenden Retikulumzellen. Im wesentlichen machen die DC in den lymphatischen Organen weniger als 1 % aller Zellen aus.

4. Reifung Dendritischer Zellen

Es ist bekannt, daß weiße Blutzellen nach ihrer Entstehung im Knochenmark eine extensive weitere Differenzierung erfahren, bis sie ihre volle immunologische Funktion zu entfalten imstande sind. Beispielsweise müssen B- und T-Lymphozyten erst lernen, Antikörper zu produzieren bzw. Lymphokine oder Zytokine zu synthetisieren.

Auch DC beginnen ihren Lebenszyklus im Knochenmark, wo sie aus hämatopoetischen Vorläuferzellen entstehen. Nachdem sie das Organ ihrer Entstehung verlassen haben, existieren sie primär als unreife Formen, die erst in einem fortgeschrittenen Entwicklungsstadium ihre charakteristische phänotypische und

funktionelle Ausprägung erfahren. Legitimation findet dieses Konzept durch die Ergebnisse zahlreicher *in vitro* Untersuchungen mit frisch isolierten und kultivierten LC. Es zeigte sich, daß epidermale LC eine *morphologische, phänotypische und funktionelle Metamorphose* durchlaufen und letztendlich zunehmend die Gestalt und Funktion jener DC annehmen, wie sie typischerweise in den lymphatischen Organen vorkommen (36). Werden beispielsweise LC in Gegenwart von Keratinozyten oder exogenem GM-CSF (77,78) kultiviert, so entwickeln sie ausgeprägte "veils" und reduzieren (Mensch) bzw. verlieren (Maus) die sog. Birbeck-Granula. Sie sind zu diesem Zeitpunkt von klassischen DC der Milz (Maus) oder des Blutes (Mensch) nicht mehr zu unterscheiden (36,79,80). Weiters spiegelt sich die phänotypische Angleichung in einer bis zu 5-fachen Zunahme von MHC Klasse II (34,79-83) wider. Zudem erfolgt gleichfalls eine Hinaufregulation bestimmter, in die T-Zell Interaktion involvierter Adhäsionsmoleküle wie CD54/ICAM-1 (79,82,84), CD58/LFA-3 (82) und CD80 bzw. CD86/B7 kostimulatorische Moleküle (85-88), andererseits gleichzeitig eine starke Reduktion der Expression bestimmter Makrophagenmarker wie ATPase oder unspezifischer Esterase (36,79,80).

Schon nach kurzer Zeit in Kultur multiplizieren frisch isolierte LC ihre bis dato schwache T-Zell stimulierende Kapazität um das bis zu 100-fache (80,89) und erreichen somit Werte, die sonst nur Milz-DC erreichen. Diese plötzliche Zunahme akzessorischer Kompetenz läßt sich nicht etwa auf die starke Zunahme von MHC Klasse II Molekülen zurückführen. Denn LC, welche zwölf Stunden kultiviert worden waren und die Expression von MHC Klasse II Molekülen bereits vollständig aufreguliert hatten, erwiesen sich als (noch) schwache T-Zell Stimulatoren (80). Vielmehr ist dafür der Umstand verantwortlich, daß sehr wohl kultivierte, nicht aber frische LC, dazu imstande sind, ruhende T-LZ in einer "Antigen-unabhängigen Weise" zu binden (= "clustering") (89,90). Die Expression des dafür verantwortlichen, noch nicht identifizierten Moleküls (91), sowie der weiteren Adhäsions- und Kostimulatormoleküle verleiht den DC ihre exzeptionelle Stimulationsfähigkeit für ruhende, naive T-Zellen.

Die Arbeit von Stingl et al. (14) wies eindeutig darauf hin, daß LC effiziente, Antigen auf eine Klasse II restringierte Weise präsentierende Zellen sind.

Diese Fähigkeit frischer LC (92,93) wird während der Kultur größtenteils reduziert, lediglich die Präsentation kleiner Peptide, welche keiner intrazellulären Prozessierung bedürfen, bleibt erhalten (92).

Zusammenfassend läßt sich somit festhalten, daß frische LC hervorragende Antigen-Prozessoren sind, gleichzeitig aber schwache T-Zell-Stimulatoren. Die als "Reifung" verstandenen oben beschriebenen Veränderungen führen dazu, daß auf die kultivierten LC jene Attribute in genau umgekehrter Weise zutreffen.

Das Konzept der Reifung DC versucht, basierend auf *in vitro* erhobenen Daten, den Lebenszyklus und die Mechanismen, welche *in vivo* zur Immunantwort führen, zu erklären. Demnach entstehen DC im Knochenmark aus bisher unbekannten Präcursorzellen, wandern dann in die peripheren Gewebe und verharren dort als "unreife DC". Dieser Prozeß ist bisher wenig verstanden (94). Unreife DC formieren in der Peripherie ein Reservoir von DC, welche, so scheint es, nach antigenem Stimulus in die lymphatischen Organe auswandern um dort als mittlerweile "gereifte DC" eine primäre Immunantwort zu initiieren. Aufgrund der Tatsache, daß in der efferenten Lymphe keine DC gefunden wurden, ist anzunehmen, daß DC keiner Rezirkulation unterliegen und die lymphatischen Organe somit Endstation im Lebenszyklus DC sind (79,80,92,93,95).

Genaue Daten zur Regulation dieses Reifungsprozesses sind noch ausständig. Anhaltspunkte sind lediglich die Triggerung der Maturation *in vitro* durch GM-CSF (77,78,96,97) sowie die Aufrechterhaltung der DC-Viabilität durch *TNF-alpha* (98) und GM-CSF. Auch für *IL-1 alpha* konnte experimentell ein *indirekter*, über vermehrte Freisetzung von GM-CSF erfolgender T-Zell stimulierender Effekt nachgewiesen werden (77,97,99). *In vivo* dürfte eine außerordentlich delicate Balance zwischen auf- und abregulierenden Zytokinen dafür verantwortlich sein, ob aus antigenem Kontakt Immunität oder Toleranz resultiert.

Tabelle 1: Reifung epidermaler Langerhanszellen - Überblick über funktionelle Eigenschaften

Kulturdauer	frisch isoliert	12-72 h
<i>Präsentation löslicher Proteinantigene</i>	+++	+/-
<i>Präsentation von Peptiden</i>	+++	+++
<i>Präsentation von Allo-MHC/Mitogene</i>	+	+++
<i>Präsentation von MHC I/II, invariant chain</i>	+++	-
<i>Saure endozytotische Vakuolen</i>	+++	+
<i>Oberflächen-Adhäsions-/kostimulatorische Moleküle</i>	+/-	+++
<i>Fc-Rezeptoren</i>	+	+/-

5. Komponenten Dendritischer Zellfunktion

Akzessorische Funktion

DC besitzen in ihrer Funktion als Antigen-präsentierende Zellen besondere Eigenschaften. Die Summe dieser verschiedenen Qualitäten verleiht ihnen ihre herausragende Effizienz bei der Stimulation naiver T-Zellen.

(a) Wachpostenfunktion peripherer Dendritischer Zellen

Periphere unreife DC sind aufgrund ihrer strategisch günstigen Lage in Gebieten mit hoher Wahrscheinlichkeit antigener Exposition dazu prädestiniert Antigen aufzunehmen, zu prozessieren und zu präsentieren. Die Mechanismen der sog. "antigen-capture" sind speziell adaptiert (100,101), wenn auch zum Teil nur während einer relativ kurzen Zeitspanne im Leben der DC (35,102). Obgleich der im Vergleich zu "professionellen" Phagozyten relativ geringen Aufnahmekapazität für AG (89,92), sind LC doch in ausreichendem Maße dazu befähigt, eine für eine effiziente T-Zell Stimulation notwendige Anzahl an Liganden i.e. MHC Klasse II/Peptidkomplexe zu generieren (103,104). Obgleich DC große Mengen Antigen-präsentierender Moleküle exprimieren, sind doch für eine spätere suffiziente T-Zell Stimualtion geringe Mengen des präsentierten Antigens ausreichend (105). Außerdem können DC Antigen über längere Perioden in immunogener Form behalten (93,105,106). Von besonderer Bedeutung für die Antigen-Präsentation dürfte zudem ein distinktes endozytotisches vakuoläres System (93,106,107) sein, ähnlich den sog. "CIIv" (i.e. Class II MHC vesicles) (108).

Die Effizienz, mit der unreife DC lösliche Proteinantigene zu prozessieren imstande sind, konnte beispielhaft anhand frisch isolierter LC demonstriert werden, grundsätzlich (93), sowie in Variationen (92,109). Vergleichende Studien an unreifen und reifen DC hinsichtlich der AG-Prozessierungspotenz (101) ersterer brachten ans Licht, daß diese sich bei frisch isolierten LC in einer großen Anzahl saurer Endosomen widerspiegelte, kultivierte LC hingegen, dieser Organellen weitgehend entbehrten (107). Wahrscheinlich ist, daß diese Organellen mit jener Aufgabe betraut sind, die für eine Präsentation von Protein-AG an T-Zellen typischerweise notwendig ist, nämlich der intrazellulären enzymatischen Degradierung von Proteinen zu kleinen Peptiden und deren folgende Assoziation mit MHC Klasse II Molekülen (110). Die Syntheserate von MHC Klasse II ist in frisch isolierten LC hoch, ebenso wie jene von "invariant chain". Beide tendieren mit fortschreitender Reifung und somit abnehmender Prozessierungspotenz rückläufig (92,95,111). Es gibt Hinweise dafür, daß "invariant chain" die Peptidbindungsstelle während der Biosynthese besetzt und diese erst wieder nach Erreichen des endozytotischen Systems freigibt, um die Anlagerung prozessierten Antigens zu ermöglichen (112). Während die Expression von "invariant chain" im Verlauf der Kultur stark abnimmt (92,95), bleibt jene der MHC Klasse II an der Zelloberfläche unverändert hoch (79,80,83). Biochemische Untersuchungen vermochten dies mit einer langen Halbwertszeit dieser Moleküle zu erklären (95). Die Fähigkeit der AG-Prozessierungs- und Präsentationspotenz konnte auch in Untersuchungen *in vivo* bestätigt werden (113). Hinsichtlich der DC der Haut bediente man sich eines *Kontaktallergiemodells*. So fand man, daß DC in den

drainierenden Lymphknoten jenes Kontaktallergen trugen, welches zuvor epikutan appliziert worden war (114). Die Gruppe um Hauser (115,116) zeigte auf, daß T-Zellen, welchen *in vitro* prozessiertes AG in immunogener Form durch LC präsentiert worden war, nach deren Transfer in normale Mäuse ebendort eine spezifische Kontaktsensibilisierung induzieren konnten (115).

Die Annahme einer Wachpostenfunktion epidermaler LC konnte zudem durch Studien von Toews et al. (117) insofern bekräftigt werden, als daß AG-Applikation auf Haut, deren epidermale LC zahlenmäßig zuvor durch UV-Bestrahlung dezimiert worden war, keine Sensibilisierung, sondern ganz im Gegenteil, Toleranz induzierte.

Welche Rolle die sogenannten "Dermalen Dendritischen Zellen" im Rahmen der Wachpostenfunktion spielen, ist noch unklar, möglicherweise wirken sie unterstützend (118,119).

Über eine regulative Einflußnahme von Zytokinen auf AG-Aufnahme und Prozessierung ist wenig bekannt. Aufgrund der bereits erwähnten Bedeutung der MHC Klasse II Moleküle wäre zu erwarten, daß Zytokine, welche deren Synthese beeinflussen, wie *Interferon gamma*, *TNF-alpha* oder *IL-4* entsprechende Effekte zeigen. Jedoch liegen hiezu keine systematischen Untersuchungen vor. Einige Beobachtungen weisen auf eine durch TNF-alpha bedingte Repression der AG-Präsentationsfähigkeit hin, welche möglicherweise durch Verlust bereits prozessierter immunogener Peptide aus der Peptidbindungsgrube des MHC Klasse II Moleküls bedingt ist (120).

In *in vivo* Experimenten konnten Vermeer&Streilein beobachten, daß die intradermale Injektion von TNF-alpha Kontaktsensibilisierung verhindert, so wie dies nach UV-B Bestrahlung der Fall war (121).

(b) Migratorische Funktion

Aufgrund der relativ geringen Anzahl von T-Lymphozyten in der Haut resultiert ebendort eine naturgemäß niedere Wahrscheinlichkeit, daß LC mit exprimierten immunogenen MHC/Peptidkomplexen auf T-Zellen treffen, die spezifisch zu ihnen "passen", und somit in der Lage wären, Immunität zu induzieren. Deshalb scheint eine Migration aus der Haut via Lymphgefäße an einen Ort hoher T-Zelldichte sinnvoll. Dafür prädestiniert sind die lymphatischen Organe, welche den ankommenden LC bzw. DC ein riesiges Reservoir an T-Zellen bieten, aus welchen sie in der Folge jene mit den passenden TCR selektieren können. Dieses Konzept der "Sensibilisierung in lymphatischen Organen" stammt ursprünglich aus Experimenten mit Hauttransplantaten (122) und Kontaktsensibilisierung (123), welche zeigten, daß zur Erlangung von Immunität ein Intaktsein der afferenten Lymphgefäße unumgänglich notwendig ist.

Die Existenz eines solchen Wanderverhalten konnte durch die Arbeit von Larsen et al. (124) unmißverständlich nachgewiesen werden. Dies wurde durch zahlreiche weitere Publikationen bekräftigt (114,125-130). Die Annahme, daß dabei die Wanderung DC via afferente dermale Lymphgefäße erfolgen würde, wurde zwar angenommen, konnte aber bisher *nicht direkt* nachgewiesen werden.

Nicht ganz ausgeschlossen werden kann die Möglichkeit, daß niedermolekulare Haptene, wie sie in den meisten Migrationsstudien zum Einsatz kommen, auf direktem Wege passiv in den Lymphknoten gelangen und sich erst dort an DC binden.

Nicht zuletzt sollte erwähnt werden, daß diesselben immunologischen Effekte, wie sie durch ausgewanderte LC bewirkt werden, möglicherweise auch durch emigrierte "Dermale Dendritische Zellen" (9,38) zustande kommen können.

(c) Adjuvante Funktion

Im lymphatischen Organ angekommen, stehen die Antigen-beladenen DC vor der Aufgabe, für ihren MHC/Peptid-, bzw. MHC/Peptid/Haptenkomplex spezifische T-Zellen zu finden und diese in weiterer Folge zur Proliferation zu stimulieren bzw. deren Zytokinproduktion anzukurbeln. Um dies zu bewerkstelligen, müssen folgende 3 Bedingungen erfüllt werden:

1. Eine antigen-unspezifische DC/T-Zell Aggregation ("clustering") (75,89,90,131) ermöglicht es reifen (nicht jedoch unreifen) DC in einer stabilen, jedoch transienten Verbindung relativ "zwanglos" sehr viele T-Zellen

auf einen etwaigen, zu ihrem MHC/Peptidkomplex passenden TCR "abzutasten". Möglicherweise wird dieser Suchvorgang noch durch die stete Bewegung der sog. "veils" erleichtert bzw. beschleunigt. Auf welche molekulare Basis dieses "clustering" gründet, ist derzeit noch nicht bekannt. Wahrscheinlich aber spielt die Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle ("clustering molecules") im Rahmen des Maturationsvorganges eine wichtige Rolle (82,91,132,133).

2. Nach erfolgreicher Suche nach einem passenden TCR erfolgt nun als nächster Schritt die *antigenspezifische DC - T-Zell Bindung* zwischen MHC Klasse II/Peptidkomplex und dem spezifischen TCR.

Die große Menge von MHC Klasse I und II Molekülen auf der DC-Oberfläche (34,134) ermöglicht es denselben, ein weites Spektrum immunogener Peptide zu präsentieren. Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zeigen, daß Antigen präsentierende Zellen eine limitierte Zahl von prädominanten immunogenen Peptiden präsentieren, sowie zusätzlich eine Vielzahl von Peptiden in großer Variation (135). Die Anzahl individueller MHC/Peptidkomplexe, welche notwendig ist, um eine T-Zelle zu stimulieren, ist relativ gering. Sie bewegt sich im Rahmen einiger hundert (104,105,136).

Zahlreiche "Molekülpaare", wie sie in *Tabelle 2* aufgeführt sind, medieren wahrscheinlich die DC/T-Zell Adhäsion und die Ingangsetzung stimulierender, interzellulärer Reaktionsabläufe. Sie können in einer *T-Zell unabhängigen* Art und Weise in relativ starkem Ausmaß (9,79,82) gleichzeitig exprimiert werden. Dies bewirkt einen deutlichen funktionellen Vorteil von DC gegenüber anderen Antigen-präsentierenden Zellen, wie beispielsweise B-LZ (105). Auch Zytokine, wie Interleukin-1beta (137,138) und Interleukin-12 (139,140) scheinen auf dieser Ebene maßgeblich beteiligt zu sein.

3. Für die T-Zell-Proliferation sind außerdem sog. *kostimulatorische Signale* notwendig, welche von DC ausgesandt werden (141). Diese Signale sind noch nicht vollständig identifiziert (142), für das *B7/BB1 (CD80)*-Molekül, welches auf reifen DC exprimiert wird (85,86,133), konnte eine kostimulatorische Funktion nachgewiesen werden (143-145). Dies gilt auch für das *B7-2 (CD86)* - Molekül (87,146-148).

Tabelle 2: Akzessorische Moleküle auf der LC-Oberfläche und Gegenpart auf der T-Zelle

Langerhanszelle

T-Zelle

ICAM-1(CD54)

LFA-1(CD11a)

ICAM-3(CD50)

"

B7-1(CD80)

CD28 & CTLA-4

B7-2(CD86)

"

Heat stable antigen

nicht bekannt

MHC Klasse -I

CD8

MHC Klasse-II

CD4

CD40

CD40 L

D. FRAGESTELLUNG

Die Fähigkeit von DC der Haut, diese verlassen zu können und über den Weg der afferenten Lymphe in Lymphknoten oder Milz zu gelangen, gilt als etabliertes Faktum. Trotz der Vielzahl erhobener Daten und der, in der Regel indirekt erbrachten Hinweise blieben viele Fragen bezüglich des Wanderungsverhaltens unbeantwortet. Insbesondere über die regulativen Mechanismen, aber auch über die Quantität und Qualität dieser Emigration ist noch relativ wenig bekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit sollte es sein, das Migrationsverhalten *humaner* kutaner DC näher zu betrachten. Als Möglichkeit einer Annäherung an die Verhältnisse "*in vivo*" bot sich die Verwendung eines Organkultursystems an, welches, sieht man von einigen Modifikationen ab, von Larsen et al. (124) übernommen wurde. Folgende Fragen sollten untersucht werden:

(1) Ist das von Larsen et al. ursprünglich für das murine System etablierte Organkulturmodell auch für Untersuchungen im Humansystem geeignet?

Erfolgt eine Emigration von DC aus der Epidermis, und wenn ja, welche Aussagen lassen sich über die Quantität bzw. Qualität dieses Verhaltens treffen? Handelt es sich hierbei um ein "starres" Verhalten oder lassen sich interindividuelle Unterschiede erkennen?

(2) Was geschieht in der darunterliegenden Dermis? Kommt es hier zu einer Akkumulation der emigrierten LC? Gelingt es, die ausgewanderten LC in den Lymphgefäßen darzustellen und ist es möglich, im Rahmen dieser Untersuchung Hinweise auf die Rolle der sog. Dermalen Dendritischen Zellen zu erhalten?

(3) Welche Mechanismen steuern diese Emigration? Besteht die Möglichkeit, in diesen Prozeß derart einzugreifen, daß eine Stimulation oder Hemmung resultiert? Kann eine derartige Modulation nur über Zytokine erfolgen oder reichen dafür bereits einfache physikalische Maßnahmen aus? Welche Emigrationskinetik zeigen derart beeinflusste DC ?

(4) Läßt sich, bezugnehmend auf die Reifung von DC, während der Wanderung eine Veränderung wie z.B. Aufregulation bestimmter Adhäsionsmoleküle auf DC nachweisen?

(5) Wie lassen sich die emigrierten DC phänotypisch und funktionell charakterisieren?