

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Untersuchungen zur Interleukin-12 Produktion und zur Migrationsfähigkeit von humanen dendritischen Zellen

Ratzinger, Gudrun

1996

I. Einleitung

I. EINLEITUNG

1. Das System der dendritischen Zellen

A. Charakterisierung

Dendritische Zellen sind eine Klasse von Leukozyten mit speziellen immunostimulatorischen Eigenschaften (1). Sie stammen aus dem Knochenmark und gehören dem System der Antigen-präsentierenden Zellen an (2). Erstmals wurden sie von Steinman und Cohn 1973 aus Mäusemilzen isoliert (3). Ihren Namen verdanken sie ihrer äußerst charakteristischen Morphologie. Das verzweigte, dendritische Erscheinungsbild ist besonders deutlich bei den dendritischen Zellen der Epidermis, den Langerhanszellen, ausgeprägt (4). Nicht verwechselt werden dürfen sie mit epidermalen Zellen mit ebenfalls dendritischer Morphologie:

- # Melanozyten, die neuroektodermalen Ursprungs sind und sich in der Basalschicht der Epidermis befinden;
- # Merkel-Zellen, die sich ebenfalls in der Basalschicht der Epidermis und auch in den epithelialen Haarwurzelscheiden befinden;
- # Thy-1 positive dendritische Zellen, bei denen es sich um T-Zellen handelt, die einen γ/δ T-Zell-Rezeptor besitzen. Diese konnten im Humansystem nur vereinzelt dargestellt werden, im Maussystem in Abhängigkeit vom Stamm.

Die Identifikation der dendritischen Zellen erfolgt durch eine Kombination von

- morphologischen (3, 4)
- phänotypischen (6, 7) und
- funktionellen (2, 8, 9) Merkmalen.

Gewebebeständige dendritische Zellen zeigen Fortsätze mit rundem Querschnitt, welche Zellorganellen beinhalten. In Kultur ist das Verhalten und die Morphologie dendritischer Zellen einzigartig. Ihre zarten, segelartigen Zytoplasmaausstülpungen

(die sogenannten "veils") verleihen ihnen ein sonnenartiges Aussehen. Diese Ausläufer enthalten keine Zellorganellen und werden ständig ausgestülpt und wieder retrahiert.

Dendritische Zellen exprimieren typischerweise eine große Anzahl von MHC-Klasse I-Molekülen sowie auch MHC-Klasse II-Molekülen auf ihrer Zelloberfläche. Außerdem finden sich verschiedene Adhäsionsmoleküle, wie zum Beispiel ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1, CD 54) und LFA-3 (Leukocyte function associated antigen-3, CD 58). Weiters werden Moleküle mit kostimulatorischer Funktion bei der T-Zellaktivierung exprimiert, wie z.B. B7-1 (CD 80) und B7-2 (CD86).

Es ist von besonderer Wichtigkeit, daß die typischen Makrophagenmarker (unspezifische Esterase, Oberflächen-ATPase, CD 14, CD 68, F4/80 Makrophagenmarker) nicht oder nur in sehr schwachem Maße auf dendritischen Zellen zu finden sind. Dieses Markerprofil weist auf die spezielle immunologische Aufgabe der dendritischen Zellen hin und differenziert sie weitgehend vom Monozyten/Makrophagen-System.

Dendritische Zellen dienen als Antigen-präsentierende Zellen für CD 4+ Helfer-T-Zellen. Sie sind daher entscheidend wichtig für die Auslösung aller T-Zell-abhängigen Immunantworten, wie z.B.

- allergische Reaktionen vom verzögerten Typ (Typ IV) oder Abwehrreaktionen gegen intrazelluläre Bakterien.
- Abstoßung von Organtransplantaten
- Bildung von T-Zell-abhängigen Antikörpern.

Dendritische Zellen sind nach dem heutigen Wissensstand die einzigen Zellen, die die Fähigkeit besitzen, naive T-Zellen, d. h. bisher nicht mit Antigen in Berührung gelangte T-Zellen oder auch ruhende T-Zellen, zu aktivieren. Nur sie sind in der Lage, eine primäre Immunantwort auszulösen. Vor allem dadurch unterscheiden sie sich markant von den bislang als Prototyp der Antigen-präsentierenden Zellen geltenden Makrophagen, aber auch von den B-Lymphozyten und den humanen venulären Endothelzellen, die in bestimmten Situationen ebenfalls als Antigen-präsentierende

Zellen dienen können. Diese Zellen können nur bereits sensibilisierte T-Zellen aktivieren und somit sekundäre Immunantworten auslösen. Bei der primären Immunantwort spielen sie daher keine Rolle.

B. Vorkommen

Seit ihrer erstmaligen Beschreibung wurden dendritische Zellen in verschiedenen lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben sowie auch im Blutkreislauf gefunden.

Das am besten analysierte Organ ist immer noch die murine Milz. In der Zellkultur gehören die dendritischen Zellen typischerweise zur nicht-adhärenenten Fraktion, besonders nach einem Tag in Kultur. Sie exprimieren nur in geringem Ausmaß Fc-Rezeptoren, jedoch in hohem Ausmaß MHC-Klasse II Moleküle. Dadurch kontrastieren sie mit Makrophagen, die die adhärenente Fraktion ausmachen, stark Fc-Rezeptoren und in variablem Ausmaß MHC-Klasse II Moleküle exprimieren (2).

System der dendritischen Zellen

Verteilung	Nomenklatur
Nicht-lymphatische Organe	Langerhanszellen interstitielle dendritische Zellen
Zirkulation	DZ der afferenten Lymphe Blut-dendritische Zellen
Lymphatische Organe	Lymphatische DZ interdigitierende dendritische Zellen

*** Dendritische Zellen in nicht-lymphatischen Organen**

Haut: Dendritische Zellen finden sich in der Haut sowohl in der Epidermis (4, 7) als auch in der Dermis (4, 10, 11). Der in der Epidermis gefundene DZ-Typ ist die Langerhanszelle und stellt die am besten charakterisierte, nicht-lymphatische dendritische Zelle dar.

Die Erstbeschreibung dieser intraepidermalen Zellen mit dendritischer Gestalt erfolgte 1868 in Berlin durch den Medizinstudenten Paul Langerhans. Da sich in seinen mit Goldchlorid gefärbten Hautpräparaten die "Nervenfasern" (Dendriten) bis in die Epidermis fortsetzten, schloß er daraus, daß es sich um Nervenfasern handeln müsse (12). Viele Jahre lang wurden sie dann kaum beachtet, bis sie Anfang der 50er Jahre im Rahmen des neurohormonalen Systems von Wiedmann wieder auftauchten (13). Später wurden die Langerhanszellen als verbrauchte Melanozyten betrachtet.

Erst die Elektronenmikroskopie ermöglichte die Entdeckung einer spezifischen Zytoplasmaorganelle, des Birbeck-Granulums, wodurch die Langerhanszelle endgültig als eigener Zelltyp definiert werden konnte. Das Auffinden dieser Birbeck-Granula in Histozyten im Rahmen der Histozytosis X bewies ihre mesenchymale Natur (14). Nach Auffindung von Oberflächenmolekülen, wie MHC II Molekül, Fc-Rezeptor und Komplementrezeptor, war ihre Natur als immunkompetente Zelle festgelegt. Studien mit Knochenmarks-Chimären (15, 16) bestätigten die Herkunft der Langerhanszelle aus dem Knochenmark und erlaubten somit die Klassifikation als Leukozyten. Die Bestimmung des Phänotyps gelang erst nach Etablierung der Methoden zur Produktion von monoklonalen Antikörpern (17).

K. Wolff stellte als erster epidermale Häutchenpräparate her, wodurch eine quantitative Einschätzung der Verteilung der Langerhanszellen möglich wurde. Die Anzahl der LZ ist abhängig von Alter, Geschlecht, MHC-Haplotyp der Maus und der Körperregion und ist starken Schwankungen unterworfen (10, 19).

Die ersten funktionellen Studien an Langerhanszellen wurden von G. Stingl, S.I. Katz et al durchgeführt. Sie erkannten dabei die Rolle der LZ als Stimulator von prolifera-

tiven und zytotoxischen T-Zellantworten (8, 20). Die klassische Arbeit von Silberberg ließ vermuten, daß den epidermalen dendritischen Zellen bei der Kontaktsensibilisierung eine wesentliche Bedeutung zukommt (18).

Früher zählte man die Linie der Langerhanszellen zum mononukleären phagozytischen System (36, 37). Diese Annahme basierte auf der Beobachtung, daß gewebsständige und frisch isolierte Langerhanszellen Makrophagenmarker exprimieren, wie z. B. Oberflächen-ATPase, nonspezifische Esterase, Fc-Rezeptoren und Komplement-Rezeptoren. Das Oberflächenantigen NLDC-145 oder auch das S 100-Protein sowie die relativ schwache Phagozytosekapazität (34, 38) und das Fehlen von Makrophagenantigenen wie z. B. CD14. (39, 40) machten diese Hypothese auf Dauer unhaltbar. Experimente von Schuler und Romani (38, 40, 44) brachten die Erklärung für diese Diskrepanzen. Durch Kultivierung werden Langerhanszellen zu typischen dendritischen Zellen, wie anhand von morphologischen, phänotypischen und funktionellen Kriterien festgestellt werden kann.

Herz: Fabre, Hart und McKenzie et al. zeigten, daß im Interstitium der meisten Organe, ausgenommen im Zentralnervensystem, unregelmäßig geformte Zellen zu finden sind, die eine starke Expression von MHC-II-Molekülen und CD45 "leukocyte common antigen" aufweisen (21, 22, 23).

Larsen et al. studierten Abstoßungsreaktionen von Herztransplantaten bei Mäusen und fanden, daß die Anzahl der interstitiellen dendritischen Zellen während der ersten vier Tage nach Transplantation stark abfällt (24). Durch die Verwendung von Antikörpern, die spezifisch für Polymorphismen des Spenders waren, konnten MHC-II reiche Spender-DZ in der Milz des Empfängers gefunden werden. Das ist ein Hinweis für die Migration von dendritischen Zellen vom Herzen via die Blutbahn in die Milz.

Zellen gleichen Charakters mit phänotypischer und morphologischer Unterscheidung von Makrophagen und starker Aktivität zur T-Zell-Stimulation lassen sich ausserdem in den Epithelien der **Luftwege**, im Interstitium des **Darms** und der **Leber** finden.

Die in den **Pankreasinseln** vorzufindenden dendritischen Zellen sind für die Abstoßung eines Pankreastransplantates verantwortlich. Dies wurde in einer experimentellen Transplantation von allogenen Inseln gezeigt (25).

* Dendritische Zellen in lymphatischen Organen

Im **Lymphknoten** befinden sich die dendritischen Zellen in den parakortikal gelegenen T-Zellarealen und werden dort als interdigitierende Retikulumzellen bezeichnet. Bei Applikation von murinen Milz-DZ in die Fußpfote oder in den Blutkreislauf beschrieben Austyn et al eine Ansammlung der injizierten Zellen in den T-Zell-Arealen der lymphatischen Organe (26).

In der **Milz** besiedeln die dendritischen Zellen die periarteriolären T-Zellareale (27, 28, 31, 32). In Schnitten kann man deutlich Nester von dendritischen Zellen erkennen, die an der Grenze zwischen T-Zellarealen und der Marginalzone der Makrophagen zu finden sind (29, 30). Sowohl T-Zellen als auch Antigene verlassen die Blutbahn in der Marginalzone. Dendritische Zellen sind wie Tore positioniert, die von den T-Zellen passiert werden müssen, bevor diese in ihre Areale wandern können.

Auch im **Thymus** und in den humanen **Tonsillen** konnten dendritische Zellen definiert werden (31, 32, 33).

*** Dendritische Zellen in der Zirkulation**

Obwohl die Isolierung und Anreicherung (ursprünglich < 0,1 %) schwierig ist, stellt das **Blut** im Humansystem die Hauptquelle für die Gewinnung dendritischer Zellen dar. Sowohl im Blut als auch in der **afferenten Lymphe** kommen dendritische Zellen als "veiled cells" vor (33, 34, 35, 36, 37, 38). Die efferente Lymphe enthält keine "veiled cells".

ZUSAMMENFASSUNG:

Dendritische Zellen verschiedener Herkunft haben folgende charakteristische Merkmale gemeinsam:

1. Sie zeigen die typische dendritische und "veiled" Morphologie.
2. Sie exprimieren in hohem Ausmaß MHC-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche.
3. Sie zeigen starke stimulatorische Kapazität für ruhende T-Lymphozyten in Proliferations-Assays wie zum Beispiel der gemischten Leukozytenreaktion.
4. Die Unterschiede zwischen dendritischen Zellen und Makrophagen werden in der nachfolgenden Tabelle 1.1 anschaulich aufgezeigt.

Tab. 1.1

Vergleiche zwischen lymphoiden dendritischen Zellen und Makrophagen		
Eigenschaft	Dendritische Zellen	Makrophagen
Cytologie		
Form	Aktive Formation von Dendriten, sog. "veils"	sessil
Kern	oval oder irregulär	nierenförmig
Mitochondrien	rund	filamentös
Endoplasm. Retikulum	mehr glattes	mehr rauhes
Endosomen, Lysosomen	wenige	viele
Cytochemie		
Unspezifische Esterase	schwach positiv oder negativ	positiv
Membran-ATPase	negativ	positiv
Alkalische Phosphatase	negativ	positiv
Adhärenz		
in Kultur	schwach oder fehlend	stark
Endozytose		
Phagozytose	schwach oder nicht phagozytisch	aktiv-phagozytisch
Pinozytose	aktiv (Makropinozytose)	sehr aktiv
Membranproteine		
spezifische Zelllinien	33D1, NLDC145; N418	F4/80
Fc-Rezeptoren	schwach oder nicht nachweisbar	hohe Expression
Komplement-Rezeptoren (CD11b/18)	schwach	vorhanden
Leukozytenantigen (CD45)	vorhanden	vorhanden
MHC Klasse I	vorhanden	vorhanden
MHC Klasse II	vorhanden (konstitutiv)	vorhanden (induzierbar)

Aus: Principles of cellular and molecular immunology, Austyn JM, Wood KJ

Es muß jedoch beachtet werden, daß die angegebenen Eigenschaften der dendritischen Zellen in Abhängigkeit ihres Reifungsgrades variieren, z. B. werden Eigenschaften, wie die Fähigkeit zur Makropinozytose oder die Expression von Fc-Rezeptoren im Verlauf der Reifung herabreguliert. Umgekehrt steigt z. B. die Expression von MHC Antigenen mit der Reifung an. (Genauerer siehe nächstes Kapitel.)

Diese Beobachtungen erlauben eine Abtrennung der dendritischen Zellen von dem Monozyten/Makrophagen-System. Eine gemeinsame Vorläuferzelle von Monozyten und dendritischen Zellen ist jedoch wahrscheinlich.

C. Die Beziehung von epidermalen Langerhanszellen zu lymphoiden dendritischen Zellen - Die Reifung dendritischer Zellen

Durch Kultivierung von epidermalen Langerhanszellen für 2 - 3 Tage machen diese eine Reihe von Veränderungen durch, die sie sowohl lymphoiden als auch Blut-DC angleicht (38). Dieser Reifungsprozeß wurde auch für andere Typen von DZ beschrieben, z. B. für Blut-dendritische Zellen

Morphologische Veränderungen:

Wenn Langerhanszellen in Gegenwart von Keratinozyten oder von GM-CSF (granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor) kultiviert werden, nehmen sie die typische Gestalt von aus der Milz isolierten dendritischen Zellen an. Sie entwickeln zahlreiche zytoplasmatische Ausläufer, sog. "veils" und verlieren (Maus) bzw. reduzieren (Mensch) die Birbeck-Granula. Ihr Aussehen wird sowohl im Lichtmikroskop als auch im Elektronenmikroskop ununterscheidbar von denjenigen dendritischen Zellen, die aus muriner Milz oder humanem Blut gewonnen wurden (42, 40, 56). Die

Gewinnungsmethoden für dendritische Zellen aus Blut oder Milz enthielten jedoch auch eine ein- bis zweitägige Kulturperiode.

Phänotypische Veränderungen:

Während der Kultivierung kommt es zu einem starken Anstieg der Expression von MHC-II-Molekülen um das Fünffache (39, 40, 41, 46). Gleichzeitig fällt die Expression von typischen Makrophagenmarkern stark ab, wie z. B. ATPase, nonspezifische Esterase, Fc-Rezeptoren und F4/80 Makrophagen-Antigen (39, 40). Außerdem kann man einen starken Anstieg von Adhäsionsmolekülen beobachten, die in die Interaktionen zwischen T-Lymphozyten und Antigen-präsentierende Zellen involviert sind: ICAM-1 (CD 54) (43, 46, 45), LFA-3 (CD 58) (45), B7-1 (Ligand für CD28), B7-2 (CD86) und MHC-I-Moleküle. Demnach exprimieren epidermale Langerhanszellen, sowohl murine als auch humane, den gleichen Phänotyp wie dendritische Zellen aus Milz oder Blut (39, 40).

Funktionelle Veränderungen:

Frisch isolierte LC sind schwache Stimulatoren von ruhenden T-Lymphozyten. Während der Kultivierung kommt es zu einer starken Zunahme der Stimulationskapazität um das 30-100-fache (38, 44). Außerdem sind Langerhanszellen nach Kultivierung in der Lage, ruhende T-Zellen auf eine Antigen-unabhängige Weise zu binden (44, 45). Diese Tatsache erklärt, zumindest zum Teil, die spezielle Fähigkeit von kultivierten LC und DC, ruhende T-Zellen zu aktivieren (48).

Stingl et al. (8) beobachteten LC als effektive Antigen-präsentierende Zellen für Proteinantigene wie Ovalbumin. Diese Präsentation beinhaltet intrazelluläres Prozessieren, d. h. enzymatische Aufspaltung des Proteins in kleine Peptide und Einbau in den Verband der MHC-II-Moleküle (53, 54). Frische LC sind sehr potente Prozessierer (46, 55), diese Fähigkeit reduzieren sie weitgehend durch die Kultivierung und werden dadurch den aus der Milz gewonnenen DC gleich (47, 56, 58).

Die Funktion des Prozessierens von Proteinen und die Funktion des Stimulierens von T-Zellen sind in frischen und kultivierten Langerhanszellen reziprok exprimiert. Frische LC sind ausgezeichnet im Prozessieren von Antigen (47, 58) aber schwach im Stimulieren von ruhenden T-Zellen. Kultivierte Langerhanszellen sowie auch aus Milz und Blut gewonnene dendritische Zellen verhalten sich genau umgekehrt (38, 40).

Langerhanszelle

Endozytose +++

Immunstimulation ±
Prozessierfähigkeit +++

**Migration als
veiled. Zelle in der
afferenten Lymphe**

**Interdigitierende
Zelle in lymphatischen
Geweben**

Endozytose ±
Immunstimulation +++
Prozessierfähigkeit ±

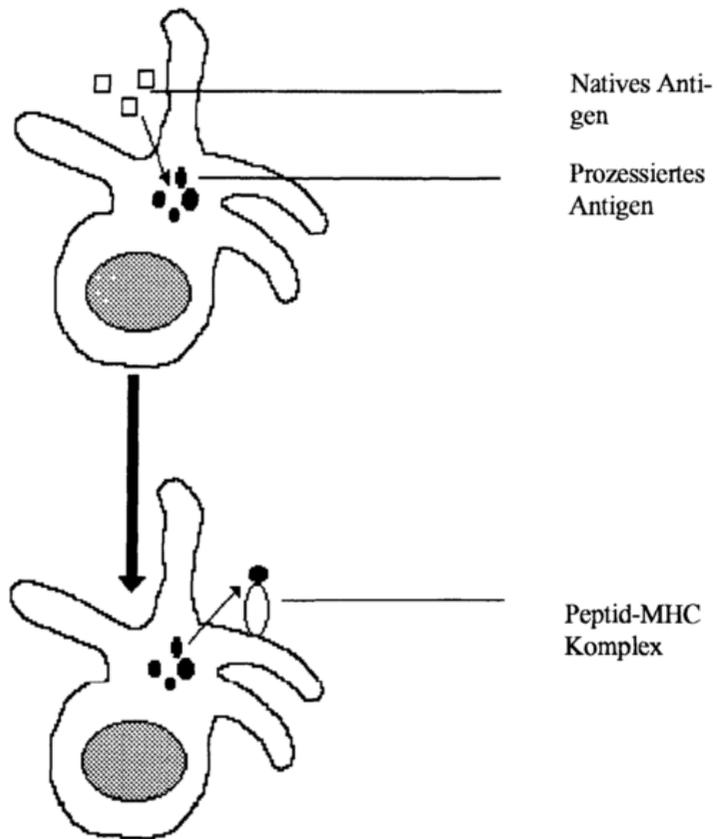


Abbildung 1.1.
aus: Austyn JM, Wood KJ, Principles of Cellular and Molecular Immunology

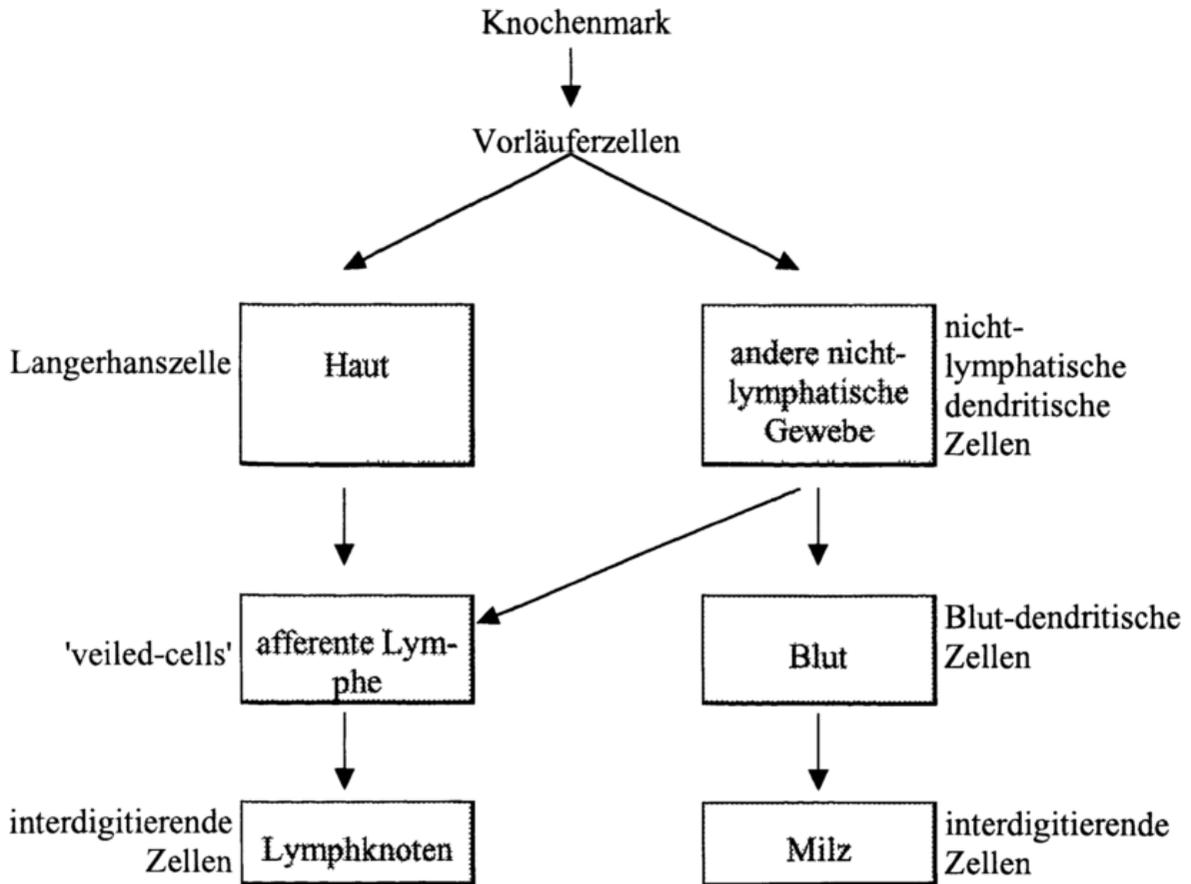
D. Der Lebenszyklus dendritischer Zellen

Der Lebenszyklus der dendritischen Zellen beginnt im Knochenmark. Die Vorläufer wandern in periphere Gewebe, wie z. B. in die Epidermis und befinden sich dort in einem unreifen Zustand. Wahrscheinlich über einen Antigen-Stimulus kommt es zur Auswanderung aus den peripheren Reservoirs. Die dendritischen Zellen gelangen über die afferente Lymphe in die Lymphknoten und über die Blutbahn in die Milz (26, 35, 49), wo sie als reife Zellen ankommen. In der efferenten Lymphe wurden keine dendritischen Zellen gefunden. Daraus schließt man, daß die lymphatischen Organe die Endstation darstellen, und keine Rezirkulation stattfindet.

Ein Teil der interdigitierenden Zellen in den T-Arealen von Lymphknoten und Milz dürften aus der Peripherie eingewanderte dendritische Zellen sein, der andere Teil besteht aus residenten DC, die ihren Reifungsprozeß in den lymphatischen Organen selbst durchmachen.

Es ist bis heute noch nicht ganz aufgeklärt, welche Zytokine die Migration der dendritischen Zellen regulieren. Einige Studien weisen darauf hin, daß die Emigration von Langerhanszellen aus der Epidermis durch TNF- α (Tumor-necrosis-factor alpha) beeinflusst wird (50, 51). Nylander-Lundquist et al. konnten IL-1 β als modulierenden Faktor identifizieren (52).

Eine ebenso wichtige Rolle in der Regulation der Migration spielen auch Adhäsionsmoleküle, deren Expression wiederum von Zytokinen reguliert wird. Aus in vitro Studien ist bekannt, daß die Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen, wie z. B. ICAM-1 (CD54) und LFA-3 (CD58) während der Kultur induziert wird (40, 43).



E. Die Rolle von dendritischen Zellen während der Immunantwort

Dendritische Zellen sind spezialisiert auf die Induktion von primären Immunantworten. Nach Steinman (2) werde ich die Mechanismen, die zu einer spezifischen Immunantwort führen, in drei Funktionsbereiche aufteilen:

- I. DZ als periphere Wachposten des Immunsystems;
Prozessierung und Präsentation des Antigens (Wächterfunktion, "sentinel function")
- II. Die Migration aus der Peripherie ins lymphatische Gewebe sichert das Auffinden von Antigen-spezifischen T-Zellen (Migrationsfunktion)
- III. Dendritische Zellen stimulieren ruhende T-Zellen (Adjuvansfunktion)

I. Die Wächterfunktion der dendritischen Zellen

Periphere unreife dendritische Zellen sind in der Lage, lösliche Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und zu präsentieren. Die Bedeutung dieser Funktion kann gut am Modell der Kontaktallergie demonstriert werden. Durch die Applikation eines niedermolekularen Kontaktallergens wie z. B. DNCB, Oxazolone, Picrylsäure *in vivo* werden intraepidermale Proteine modifiziert und werden somit zum Antigen. Dieses modifizierte Protein wird wie jedes andere Fremdprotein von den LZ zu kurzen immunogenen Peptiden proteolysiert, welche dann in speziellen Organellen in die neu synthetisierten MHC-II-Moleküle eingepaßt werden. Im Anschluß daran werden die neu generierten MHC-II/ Peptidkomplexe auf der Oberfläche der Langerhanszellen exprimiert (53, 54).

Von besonderer Bedeutung für die Antigen-Präsentation ist ein endozytotisches vakuoläres System, das mit großer Wahrscheinlichkeit für die Proteolyse von Fremdproteinen und die Assoziation der Peptide mit MHC-Klasse II-Molekülen verantwortlich ist (57). Diese Annahme wird bestärkt von der Tatsache, daß mit Abnahme der Endosomen im Zuge der Reifung die Prozessierungspotenz der LZ rückläufig ist (56). In umgekehrter Weise verhält sich die Syntheserate der MHC-II-Moleküle (39, 46, 59). Es konnte gezeigt werden, daß LZ, die aus Hapten-behandelter Epidermis isoliert wurden, dieses Antigen in immunogener Form an ihrer Oberfläche exprimieren; damit sind sie in der Lage, Antigen-spezifische T-Zellen zu stimulieren (60).

Die Fähigkeit der DZ, Antigen zu prozessieren und zu präsentieren, wurde *in vivo* durch ein Kontaktallergiemodell bestätigt. Es wurde beobachtet, daß nach epikutaner Applikation von Kontaktallergenen haptenbeladene DZ in den regionalen Lymphknoten erschienen. Hauser et al demonstrierten *in vitro*, daß LZ haptenisierte Antigene aufnehmen können, um sie dann ruhenden T-Zellen zu präsentieren. Nach Transfer dieser stimulierten T-Zellen in normale Mäuse können diese dort eine spezifische Kontaktsensibilisierung induzieren (61). Wird jedoch ein Hapten auf Haut aufgetragen,

deren LZ-Dichte durch vorhergehende Behandlung mit DNFB (Dinitrofluorobenzene) vermindert wurde, so kann keine Kontaktsensibilisierung mehr erfolgen; es kommt zur Toleranzentwicklung (62). Gleiches kann man beobachten, wenn die LZ-Funktion durch vorhergehende UV-B-Bestrahlung gehemmt wurde (43). Wahrscheinlich spielt hier das Zytokin TNF- α eine Rolle (51).

Für den speziellen Fall der Nickelallergie konnte die Gruppe von Sinigaglia (63) zeigen, daß das Nickel-Ion an das Histidin prozessierter, d.h. MHC-gebundener Peptide bindet. Weiterhin konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, daß der therapeutische Effekt von Gold bei der Behandlung der rheumatoiden Arthritis wahrscheinlich über einen ähnlichen Effekt funktioniert. Das Gold lagert sich an den MHC/Peptid-Komplex und stört so die Präsentation des Selbstantigens an die spezifischen T-Zellen. Gleichzeitig kann über den derartig alterierten MHC/Peptid-Komplex die Proliferation von zytotoxischen T-Zellen generiert werden, die eine als Komplikation gefürchtete Typ IV-Reaktion gegen Gold bewirken können.

Über den Einfluß von Zytokinen auf das Prozessieren und Präsentieren von Antigen ist noch wenig bekannt. Es wäre jedoch ein Einfluß der Zytokine TNF- α (Tumornecrosis-factor alpha), Interferon γ und Interleukin 4 zu erwarten, da sie einen Einfluß auf die Biosynthese der MHC-Moleküle haben (64, 65, 66, 67). Einige Experimente weisen jedoch eher auf eine hemmende Rolle des TNF- α hin. Durch TNF- α kommt es zu einer Hemmung der Präsentationsfähigkeit, die wahrscheinlich auf einen Verlust bereits prozessierter immunogener Peptide aus der Peptidbindungsgrube des MHC-II-Moleküls zurückzuführen ist (68). Vermeer und Streilein konnten in vivo zeigen, daß die intradermale Injektion von TNF- α Kontaktsensibilisierung verhindert, so wie dies nach UV-B-Bestrahlung der Fall war (51).

Durch diese Untersuchungen scheint die Wachpostenfunktion der epidermalen dendritischen Zellen, im besonderen was die Kontaktsensibilisierung betrifft, wahrscheinlich. Dermale DZ haben möglicherweise eine unterstützende Funktion (70).

II. Die migratorische Funktion der dendritischen Zellen

Antigene treffen primär auf Oberflächenepithelien oder auf darunterliegende Bindegewebe. Somit liegen die unreifen dendritischen Zellen strategisch günstig in der Epidermis, um Antigene aufzunehmen und zu prozessieren.

Die beladenen LZ wandern anschließend über die afferenten Lymphgefäße in die parakortikalen T-Zellareale der Lymphknoten, wo sie T-Zellen auffinden, die spezifisch zu ihnen passen und in der Lage sind, Immunität zu induzieren. Diese Wanderung ist nötig, weil die T-Zell-Dichte in der Haut sehr niedrig ist. Dieses Erkenntnis stammt aus Hauttransplantationsstudien (71) und Kontaktsensibilisierungsstudien (78), die gezeigt haben, daß die afferenten Lymphgefäße intakt sein müssen, um eine immunologische Reaktion zu erhalten. Die in den Lymphknoten angelangten reifen dendritischen Zellen sind ident mit den interdigitierenden Retikulumzellen. Die Mechanismen, die dieses homing bewirken, sind relativ unbekannt. Verschiedene Adhäsionsmoleküle (ICAM-1/CD 54, LFA-3/CD 58), die auf den heranreifenden LZ vermehrt ausgebildet werden, dürften dabei eine Rolle spielen (73, 74, 75, 76). Auch das E-Cadherin-Molekül, das auf heranreifenden LZ herabreguliert wird, könnte eine Rolle spielen.

Es gibt einige Studien, die das Wanderverhalten dendritischer Zellen nachweisen:

- Die Applikation von Kontaktallergenen führt zu einer Abnahme der LZ-Zahl in der Epidermis um ein Drittel (78, 79)
- Larsen zeigte in einem Organkulturmodell, daß die Anzahl der LZ in der Epidermis sich vermindert, während die MHC-II positiven Zellen in der Dermis zunehmen. Nach drei Tagen waren typisch aussehende DZ aus dem Organ ins Medium gewandert (80).
- Nach epikutaner Kontaktsensibilisierung erkennt man eine Zunahme von DZ in den abfließenden Lymphgefäßen und in den regionalen Lymphknoten (81, 82).

Inwieweit Zytokine die Migration beeinflussen, ist noch relativ unbekannt. In letzter Zeit summieren sich jedoch die Hinweise, daß TNF- α eine Schlüsselrolle zukommt:

- * Durch intradermale Injektion von TNF- α kommt es einer Abnahme von LZ in den angefertigten Epidermalsheets (51).
- * Nach intradermaler Injektion von TNF- α beobachtet man einen erhöhten Influx von DZ in den versorgenden regionalen Lymphknoten (50) und eine Abnahme der LZ in der Epidermis (77).
- * Nach Applikation von Irritantien und sensibilisierenden Substanzen kommt es zu einem Anstieg der epidermalen Zytokinproduktion. Die PCR (Polymerase-chain-reaction)-Analyse zeigte einen Anstieg von TNF- α und GM-CSF. Spezifisch nach Applikation von sensibilisierenden Substanzen kommt es zu einem Anstieg der mRNA für IL-1- α in Keratinozyten und für IL-1- β in LZ, für Interferon-induziertes Protein 10 (IP-10) und Makrophagen-inflammatorisches Protein 1 α und 2 (MIP 1 α und 2) (83, 84).

III. Die adjuvante Funktion der dendritischen Zellen

Die Migration der dendritischen Zellen in die Lymphknoten ist sinnvoll und notwendig, weil nur dort eine realistische Chance besteht, die für die jeweiligen MHC/-Peptid- bzw. MHC/Peptid/Hapten-Komplexe spezifischen T-Zellklone aufzufinden. Sind die T-Zellen stimuliert, proliferieren sie und produzieren Zytokine. Die Aktivierung der passenden T-Zellen erfolgt in drei Schritten (85):

1. Reife dendritische Zellen, wie sie nach der Migration in den Lymphknoten zu finden sind, sind fähig, ruhende T-Zellen in einer Antigen-**un**abhängigen Weise in relativ stabilen aber reversiblen Aggregaten zu binden (44, 45, 86). Auf diese Weise kann aus einem großen Angebot von T-Zellen die mit dem passenden T-Zell-Rezeptor herausgefunden werden. Das Phänomen der Bildung von großen Zellaggregaten ("cluster"-Bildung) kann im Phasenkontrastmikroskop gut beobachtet werden. Die molekularbiologischen Mechanismen für dieses Phänomen sind bis jetzt noch nicht nicht bekannt. Wahrscheinlich aber spielt die Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle im Rahmen des Reifungsprozesses der dendritischen Zel-

len eine Rolle. Das Antigen-unspezifische "clustering" kann nur bei reifen dendritischen Zellen und nicht bei anderen APZ beobachtet werden (6, 40, 42, 86)

2. Nach erfolgreicher Suche nach dem passenden T-Zellrezeptor erfolgt nun als nächster Schritt die **Antigen-spezifische** DZ-T-Zell-Bindung zwischen MHC II/Peptidkomplex und dem spezifischen 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 (5, 88). Eine APZ, insbesondere eine DZ kann also eine sehr große Zahl von verschiedenen Peptiden präsentieren. Wahrscheinlich werden sehr wenige identische MHC-Peptidkomplexe benötigt, ungefähr 100, um ruhende T-Zellen zu stimulieren. Das Anti-CD3-Mitogenese-Modellsystem und andere Studien weisen auf die Notwendigkeit einer geringen Anzahl hin (89, 90).

Für die Antigen-spezifische Bindung zwischen DZ und T-Zellen sind einerseits akzessorische Oberflächenmoleküle von besonderer Bedeutung.

3. Für die T-Zell-Proliferation sind weiterhin noch **kostimulatorische** Signale nötig, welche von den DZ gebildet werden (95). Diese Signale sind biochemisch nicht vollständig identifiziert (96). Für das B7-1 (CD80)-Molekül, welches auf reifen DZ exprimiert wird (97, 98, 87), wurde eine kostimulatorische Funktion nachgewiesen (99, 100, 101). Dies gilt auch für das B7-2 (CD86)-Molekül (102, 103, 104, 105).

F. Wichtige Membranproteine dendritischer Zellen

<i>Dendritische Zelle</i>	<i>Gegenpart auf der T-Zelle</i>
ICAM-1 (CD54)	LFA-1(CD11a)
ICAM-3 (CD50)	LFA-1(CD11a)
B7-1 (CD80)	CD28 und CTLA-4
B7-2 (CD86)	CD28 und CTLA-4
MHC Klasse I	CD8
MHC Klasse II	CD4
CD40	CD40 Ligand

ICAM-1 und ICAM-3 agieren als Adhäsionsmoleküle, B7-1 und B7-2 haben kostimulatorische Funktion bei der T-Zellaktivierung, MHC Klasse I und MHC Klasse II sind für die MHC gekoppelte Antigen-Präsentation von Bedeutung.

CD40 ist ein integrales Membranprotein, welches auf der Oberfläche von B-Lymphozyten, reifen dendritischen Zellen, folliculären dendritischen Zellen, hämatopoietischen Vorläuferzellen, Epithelzellen und z.T. auch von Karzinomzellen exprimiert wird (168). Das CD40 Molekül bindet an seinen Liganden, welcher erst kürzlich identifiziert wurde. Er stellt ein 39 kDa Protein (gp39) dar, welches vorwiegend von aktivierten CD4 positiven T-Helferzellen exprimiert wird. Die Wechselwirkung CD40/CD40 Ligand ist einerseits für die B-Zell-Funktion und andererseits für die T-Zell-Aktivierung und Funktion von Bedeutung (169, 170). Koch et al. zeigten auf, daß die Bindung an das CD40 Molekül dendritischer Zellen zu einem Anstieg der IL-12 Produktion dieser Zellen führt (165). Interleukin-12 ist ein zentrales Zytokin in der Immunabwehr und beteiligt sich sowohl an der angeborenen als auch an der erworbenen Abwehr (108).

2. Die Rolle von Interleukin 12 in der Immunantwort

Interleukin 12 ist ein heterodimeres Zytokin. Es wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen als Antwort auf bakterielle Produkte, wie z. B. LPS (Lipopolysaccharid), auf lebende oder Hitze-inaktivierte Bakterien, wie z. B. *Staphylococcus aureus* oder auf intrazelluläre Pathogene, wie z. B. *Listeria monocytogenes* produziert. Zu den Produzenten von IL-12 gehören außerdem humane Keratinozyten, neutrophile Granulozyten, B-Zellen, Mastzellen, Langerhanszellen und andere MHC-Klasse II positive Zellen aus dem peripheren Blut, wie z. B. dendritische Zellen (106 - 111).

Interleukin 12 (IL-12) ist ein zentrales Zytokin in der Immunantwort. Es ist ein Bindeglied zwischen der angeborenen und der erworbenen Abwehr. IL-12 induziert die Produktion von Zytokinen, besonders von $\text{INF } \gamma$, durch NK-Zellen (natural killer) und T-Zellen, es agiert als Wachstumsfaktor für aktivierte NK-Zellen und T-Zellen, es steigert die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen und fördert die Entwicklung zytotoxischer T-Zellen.

IL-12 agiert an drei Punkten der Infektantwort:

- a. In der frühen Phase der Infektion induziert IL-12 die Produktion von $\text{INF } \gamma$ durch NK-Zellen und T-Zellen. $\text{INF } \gamma$ trägt zur Aktivierung phagozytischer Zellen und zur Entzündung bei.
- b. IL-12 und $\text{INF } \gamma$ favorisieren die Differenzierung von CD4 positiven Zellen in Richtung Th1 Zellen.
- c. IL-12 trägt zu einer optimalen $\text{INF } \gamma$ Produktion und Proliferation von differenzierten Th1 Zellen als Antwort auf Antigen bei.

Somit bildet das Zytokin IL-12 eine funktionelle Brücke zwischen unspezifischer angeborener Abwehr und Antigen-spezifischer erworbener Immunität (108). Eine Übersicht über die Funktion von IL-12 während der Infektantwort bietet Abb. 2.1.

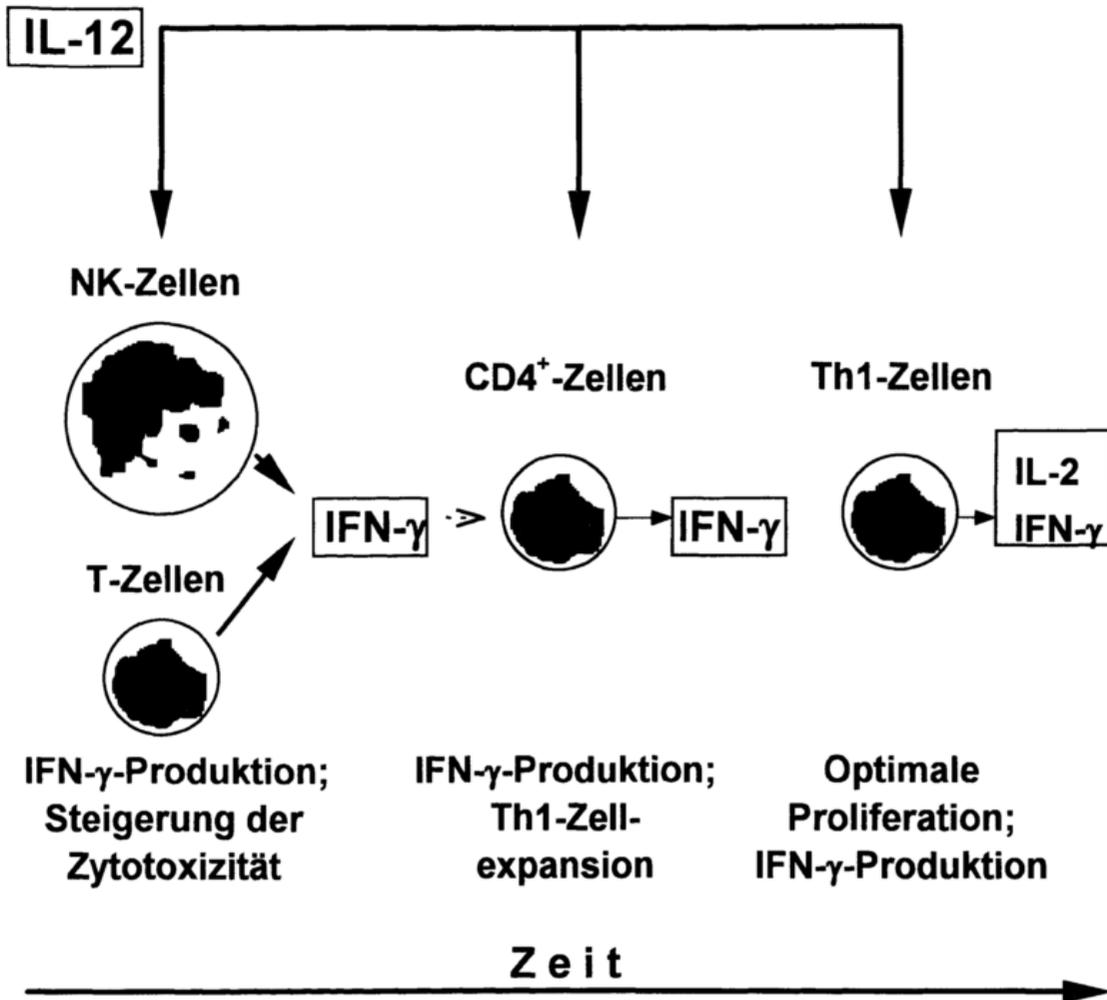


Abb.2. 1 (aus: 108)

A. Entdeckung von IL-12

Die erste Spur von IL-12 war die Vermutung, daß es Faktoren gibt, die in vivo als Antwort auf bakterielle Infektionen oder in vitro durch EBV-transformierte (Epstein Barr Virus) humane lymphoblastoide B-Zelllinien produziert werden, und die in der Lage sind, die Produktion von Interferon γ zu induzieren. Diese Faktoren sind aus-

serdem fähig, NK-Zellen (natural killer cells) zu aktivieren und als Wachstumsfaktoren für T-Zellen und NK-Zellen zu agieren.

- * Bakterien wurden beschrieben als Aktivatoren von NK-Zell-Zytotoxizität und von INF γ -Produktion. Diese Beobachtungen wurden *in vitro* (130) und *in vivo* (131, 132) gemacht.
- * Im Serum von LPS-behandelten (Lipopolysaccharid) Mäusen wurde INF γ induzierende Aktivität nachgewiesen (133)
- * Reem et al. zeigten, daß EBV-transformierte B-Zelllinien das Wachstum von T-Zellen und NK-Zellen erleichterten, und einen Faktor sezernierten, der die INF γ -Produktion induzierte (134, 135).

Durch Analyse der durch EBV-transformierte Zelllinien produzierten Faktoren wurde der NSKF (natural killer cell stimulatory factor) identifiziert mit verschiedenen Funktionen an humanen T-Zellen und NK-Zellen: Induktion von INF- γ Produktion, Steigerung der zell-mediierten **Zytotoxizität**, **mitogene Effekte** an ruhenden T-Zellen (112).

Später wurde im konditionierten Medium einer EBV-transformierten Zelllinie ein Faktor mit der Fähigkeit, die Wirkung von IL-2 zu unterstützen, gefunden und CLMF (cytotoxic lymphocyte maturation factor) genannt. Durch Reinigung und Genklonierung zeigte sich, daß NKSF und CLMF ident sind; heute ist für dieses Zytokin die Bezeichnung Interleukin 12 gebräuchlich.

B. Charakterisierung des IL-12 Moleküls

IL-12 ist ein Zytokin mit heterodimerer Struktur mit einem spezifischen Gewicht von 70 kDa (p70). Es setzt sich aus zwei glykosylierten Ketten zusammen (40 kDa und 35 kDa), die kovalent miteinander verbunden sind (112). Der Genabschnitt für die p40 Kette befindet sich auf Chromosom 5q31 - q33, jener für die p35 Kette auf Chromo-

som 3p12 - 3q13.2 (113). Die Sequenzhomologie zwischen den humanen und murinen Genabschnitten beträgt 60 %, wobei murines IL-12 sowohl an murinen als auch an humanen Lymphozyten Wirkung zeigt, humanes IL-12 jedoch nur an humanen Lymphozyten (114). Heterodimere, die aus Monomeren beider Spezies bestehen, sind an humanen Lymphozyten nur dann wirksam, wenn die p35 Kette humanen Ursprungs ist. Aus diesen Beobachtungen kann man schließen, daß die p35 Kette für die Speziespezifität verantwortlich ist.

Die p35 Kette besteht aus vier α -Helices, die antiparallel angeordnet sind. Diese Sekundärstruktur kann bei einem Großteil der Zytokine gefunden werden. Bei einem Vergleich der Aminosäuresequenz der p35 Kette mit jenen von IL-6 und GM-CSF zeigt sich, daß viele Positionen identisch konserviert wurden. Untersuchungen von Zhou et al. zeigten, daß sich das p35 Molekül sowohl an der Rezeptorbindung beteiligt als auch die Signaltransduktion bestimmt (118).

Die Aminosäuresequenz der p40 Kette ist jener des IL-6 Rezeptors, des GM-CSF Rezeptors und der α -Kette des CNTF Rezeptors (ciliary neurotrophic factor) homolog und zeigt Zeichen der Hämopoietin-Rezeptorfamilie (114, 115, 116). Die Funktion des p40 Moleküls besteht in der Rezeptorbindung während es an der Induktion des biologischen Signals nicht beteiligt ist.

Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß IL-12 aus einem primordialen Zytokin mit Ähnlichkeit zu IL-6 oder CNTF und der extrazellulären Domäne einer Kette von dessen Rezeptor entstanden ist.

Die Interaktion der beiden Ketten des IL-12 erfolgt über eine Disulfidbrücke und ist deshalb irreversibel. Es wurde beobachtet, daß eine Mischung von rekombinanten p35 und p40 Ketten die biologischen Funktionen von IL-12 mediiert. Die beiden Ketten zeigen eine Bindungsaffinität, die Konzentrationen müssen jedoch bei Verwendung der Monomere um das Dreifache höher sein als bei Verwendung von kovalent gebundenem IL-12, um vergleichbare Wirkungen zu erzielen (119).

C. Produktion von IL-12

Die Produktion von bioaktivem IL-12 setzt voraus, daß die Gene, die das p35 und das p40 Molekül kodieren, simultan exprimiert werden (120, 121). Transkripte des p35 Gens werden, wenn auch in geringem Ausmaß, in fast allen analysierten Zelltypen exprimiert (122, 123). Im Gegensatz dazu konnten keine signifikanten Mengen des p35 Proteins nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß die Sekretion von p35 Ketten nur dann in effizienter Weise stattfindet, wenn es zur Assoziation mit p40 Molekülen zur Bildung von IL-12 Heterodimeren kommt.

Die Expression der p40 Gene beschränkt sich auf jene Zelltypen, die in der Lage sind IL-12 zu produzieren (122, 123). Obwohl die Expression der beiden Gene durch Aktivierung der produzierenden Zellen reguliert wird, wird die Expression des p40 Gens interessanterweise wesentlich höher reguliert als die des p35 Gens (124, 125).

Die Hypothese, daß IL-12 von einem primordialen Zytokin/Rezeptorkomplex stammt, wird durch die Tatsache kompliziert, daß die zugehörigen transmembranen Ketten des IL-12 Rezeptors von Zelltypen (T-Zellen, NK-Zellen, hämatopoietische Stammzellen) exprimiert werden, die weder IL-12 produzieren noch IL-12 p40 exprimieren (127, 130, 131). Alle Zelltypen, die biologisch aktives IL-12 produzieren, produzieren gleichzeitig freie p40 Moleküle im Überschuß. Das Verhältnis IL-12 : freie p40 Ketten beträgt zwischen 1 : 10 und 1 : 50 (122, 129). Die physiologische Funktion der Überproduktion der freien p40 Moleküle ist noch nicht klar. Möglicherweise antagonisiert p40, im besonderen als Homodimer, die biologische Aktivität des p70 Heterodimers (119). Natürlich vorkommendes p40 Homodimer wurde jedoch noch nicht gefunden.

Im Moment ist es schwierig, die geringe Coregulation der beiden IL-12 Gene zu verstehen: Einerseits die Überproduktion von freien p40 Ketten in den IL-12 Produktionszellen, andererseits die Expression von p35 Transkripten in Zellen, die mit der IL-12 Produktion nichts zu tun haben. Möglicherweise erfüllen die beiden Ketten als

Monomere oder als Heterodimere mit anderen Polypeptiden Aufgaben, die zur Zeit noch nicht bekannt sind (108).

D. Biologische Funktionen von IL-12

a. Einfluß auf die Hämatopoiese

IL-12 agiert synergistisch mit anderen hämatopoietischen Wachstumsfaktoren. Es fördert die Proliferation und die Überlebenszeit von Stammzellen in der Kultur und führt zu einer Zunahme der Kolonien an Zahl und Größe, die von frühen multipotenten hämatopoietischen Stammzellen gebildet werden (136, 137, 138). Diese Effekte können bei Verwendung von gereinigten Stammzellen beobachtet werden. In Anwesenheit von NK-Zellen ändert sich die Wirkungsweise von IL-12. NK-Zellen produzieren als Antwort auf IL-12 TNF α und INF γ , die einen inhibitorischen Effekt auf die Hämatopoiese zeigen (139). Diese antagonistischen Effekte von IL-12 konnten im Mausmodell aufgezeigt werden. Nach wiederholten IL-12 Injektionen kommt es zu einer Reduktion der medullären Hämatopoiese mit Anämie und Neutropenie. Gleichzeitig findet man Herde extramedullärer Hämatopoiese in der Leber und in der Milz begleitet von Hepatotoxizität und Splenomegalie (139).

b. Induktion von Zytokinen

IL-12 induziert die Produktion verschiedener Zytokine von T-Zellen und NK-Zellen: IFN γ , TNF α , GM-CSF, M-CSF, IL-3, IL-8, IL-2 (112, 120, 127, 140, 142, 143, 144). IL-12 ist besonders effektiv in der Induktion von INF γ .

1. Im Vergleich zu anderen Zytokinen ist die Induktion von INF γ durch IL-12 effektiver.

2. IL-12 wirkt stark synergistisch mit anderen Stimuli in der Induktion von maximalen Mengen von INF γ .

Die Induktion von INF γ ist die wichtigste physiologisch relevante Funktion von IL-12. Viele Effekte von IL-12 werden zumindest zum Teil von INF γ mediiert (112, 127). An T-Zellen wirkt IL-12 synergistisch mit IL-2, Phorboldiester, Lectinen und T-Zellrezeptorstimuli, wie z. B. Anti-CD3-Antikörper, Alloantigene und spezifische Antigene (127, 141); an NK-Zellen wirkt IL-12 synergistisch mit IL-2, Phorboldiester, Fc-Rezeptorliganden und NK-sensitiven Zielzellen (127, 141).

Sowohl ruhende als auch aktivierte T-Zellen und NK-Zellen antworten auf IL-12 mit INF γ Produktion. Die Neutralisation von TNF α oder IL-1 β in IL-12 stimulierten Kulturen führt zu einer signifikanten Inhibition der INF γ Produktion (124). Die synergistische Wirkung von TNF α mit IL-12 in der Induktion von INF γ konnte im Maussystem verifiziert werden (145). Folglich kann man annehmen, daß TNF α und IL-1 als Cofaktoren der IL-12 mediierten INF γ Induktion wirken.

Einen weiteren Synergismus stellt die Interaktion zwischen dem CD28 Rezeptor der T-Zellen und seinem B7 Ligand dar. Das rekombinante CTLA4-Ig Molekül, das die Interaktion B7/CD28 verhindert, führt zu einer signifikanten Inhibition der INF γ Induktion durch IL-12 (125, 143).

Die Stimulation von T-Zellen während der Antigen-Präsentation erfolgt über den TCR/CD3 Komplex und wird unterstützt durch den membrangebundenen Cofaktor B7, der mit dem CD28 Rezeptor interagiert, und durch den löslichen Faktor IL-12, der von den APZ produziert wird. Maximale INF γ Produktion kann nur dann beobachtet werden, wenn diese drei Stimuli simultan auf die T-Zellen wirken (125, 143).

Sowohl im Maus- als auch im Humansystem konnte die inhibitorische Funktion von IL-10 auf die Induktion von INF γ nachgewiesen werden. Sie erfolgt *erstens* durch Suppression der IL-12 Produktion durch akzessorische Zellen, *zweitens* durch Suppression der Produktion der Cofaktoren TNF α und IL-1 und *drittens* durch Hem-

mung der Expression von B7 Molekülen auf der Oberfläche der akzessorischen Zellen (124, 125, 143).

Die synergistische Wirkung von IL-12 und IL-2 bezieht sich fast ausschließlich auf die Induktion von INF γ (142). Der molekulare Mechanismus dieses Synergismus wurde analysiert: IL-12 führt zu einer Induktion der INF γ Gentranskription, während IL-12 und IL-2 gemeinsam zu einer Erhöhung der INF γ m-RNA-Halbwertszeit führen. Die Wirkung von IL-12 erfolgt also auf transkriptionaler und posttranskriptionaler Ebene (146).

c. Steigerung der Zell-medierten Zytotoxizität

Die Behandlung von PBLs (periphere Blutlymphozyten) oder gereinigten NK-Zellen mit IL-12 verursacht innerhalb weniger Stunden eine signifikante Steigerung ihrer Zytotoxizität (112, 147). Die maximale Steigerung, die durch IL-12 gewährleistet wird, ist geringer als die durch IL-2 und vergleichbar mit jener durch INF α (112). Maximale Effekte wurden durch eine Kombination von IL-2 und IL-12 beobachtet (112, 148). Die Steigerung der Zytotoxizität zeigt sich in einem Anstieg der Granularität der NK-Zellen (149) und in einer Erleichterung der Stimulus-abhängigen Exozytose (150).

Zusätzlich befähigt IL-12 CD3 positive periphere T-Zellen zur Lyse Anti-CD3 Antikörper beschichteter, Fc-Rezeptor positiver Zielzellen (149). IL-12 fördert die Anti-CD3-induzierte Entwicklung von zytotoxischen CD8 positiven T-Zellen (150) und steigert in vitro die Bildung von CTL (zytotoxische T-Lymphozyten) (151, 152).

d. Mitogene Effekte an T-Zellen und NK-Zellen

IL-12 führt an ruhenden T-Zellen oder NK-Zellen zu einer sehr geringen oder zu keiner Proliferation. Im Gegensatz dazu kommt es an T-Zellen nach Kontakt mit PHA (Phytohämagglutinin), Alloantigenen, Phorboldiester oder IL-2 sehr wohl zu einer

Proliferationssteigerung durch IL-12 (108, 112, 141, 153). Eine direkte Induktion der Proliferation kann an aktivierten T-Zellen und NK-Zellen beobachtet werden. Der maximale Effekt beträgt jedoch nur 10 % - 50 % jenes Effekts, der durch IL-2 mediiert wird.

IL-12 induziert nur dann Proliferation von T-Zellen, wenn diese durch Antigen oder Anti-CD3-Antikörper prä- oder kostimuliert werden. Diese Tatsache weist darauf hin, daß die Expression des IL-12 Rezeptors, der für die Proliferationsinduktion benötigt wird, nur vorübergehend durch TCR/CD3 Stimulation hochreguliert wird (141).

Kostimulation durch IL-2 und IL-12 zeigt meist einen additiven Effekt. IL-12 wirkt jedoch dann inhibitorisch, wenn T-Zellen durch hohe Dosen IL-2 sehr stark in ihrer Proliferation stimuliert sind. IL-12 führt die Proliferation auf jene Ebene zurück, die es allein bewirkt hätte (141, 147). Dieser antagonistische Effekt ist abhängig vom Aktivierungsstatus der Lymphozyten:

- a) keine Inhibition bei hochaktivierten NK-Zellen
- b) keine Inhibition bei geringen IL-2-Dosen

Der inhibitorische Effekt von IL-12 wird durch neutralisierende Antikörper gegen TNF α verhindert, obwohl TNF α allein keine hemmende Funktion hat. Wahrscheinlich werden beide Zytokine für die Inhibition benötigt. IL-12 steigert die Expression des TNF-Rezeptors an NK-Zellen und sensibilisiert dadurch diese für den antiproliferativen Effekt von TNF α .

IL-4 hemmt die IL-2 induzierte Aktivierung der NK-Zelle, es beeinflusst jedoch die IL-12 induzierte Proliferation positiv (154).

IL-12 wirkt synergistisch mit der B7/CD28 Stimulation von T-Zellen. Die Proliferationsinduktion ist wesentlich deutlicher, als sie mit optimalen IL-2 Konzentrationen beobachtet wurde (143). Aktivierung über den TCR/CD3 Komplex durch Antigen, Lectine oder Antikörper ist jedoch für eine optimale Proliferation nötig (143).

Zur Erlangung eines optimalen Effekts sind wiederum drei Faktoren von Bedeutung:

- * Expression von B7 an der Oberfläche der APZ
- * Aktivierung des TCR/CD3 Komplexes
- * Sekretion von IL-12

E. IL-12 mediiert die Entwicklung von T-Helferzellen 1 (Th1 Zellen)

Naive CD4 positive T-Zellen produzieren nach Stimulation IL-2. Durch Priming entwickeln sich diese Zellen entweder in Th1 Zellen, die INF γ , TNF β und IL-2 produzieren (172), oder in Th2 Zellen, die IL-4 und verwandte Zytokine produzieren. Zytokine (159, 160, 161, 162, 163), die entweder von den T-Zellen selbst oder von den APZ produziert werden (164), spielen in diesem Differenzierungsprozeß eine wichtige Rolle. Verschiedene Studien, sowohl im Maussystem (155, 156, 93) als auch im Humansystem (93, 157, 158, 156) zeigten die Rolle von IL-12 in dieser Differenzierung auf.

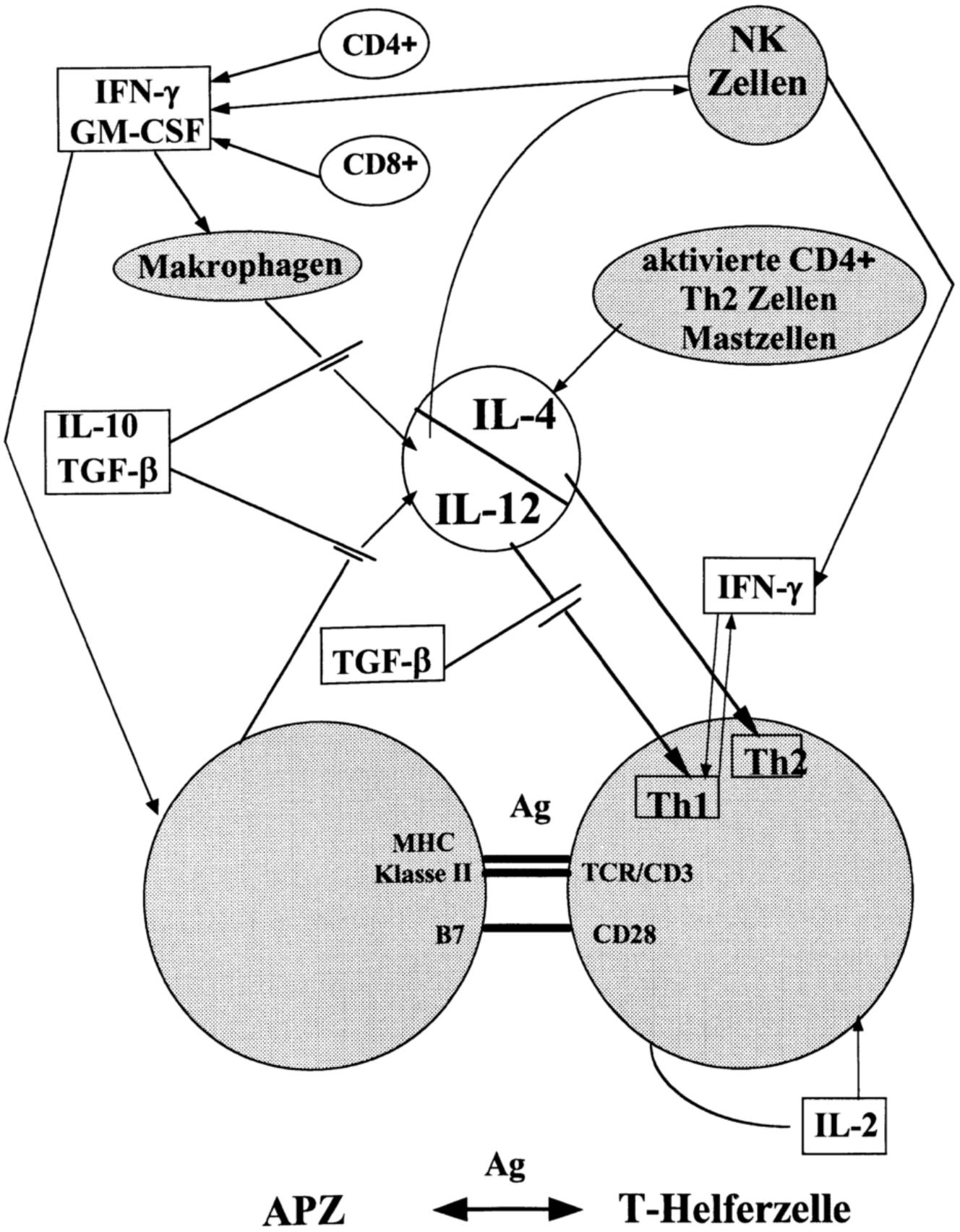
IL-12 agiert als Promoter der Entwicklung von Th1 Zellen und fungiert als Antagonist von IL-4, dem Promoter der Entwicklung von Th2 Zellen.

Die Balance zwischen IL-12 und IL-4 spielt eine zentrale Rolle in der T-Zelldifferenzierung. APZ interagieren mit T-Zellen über den TCR/CD3 Komplex, über den CD28 Rezeptor und über den löslichen Faktor IL-12. Dadurch kommt es zur Produktion von INF γ und zur T-Zellproliferation. IL-12 wird auch von Makrophagen und anderen Zelltypen synthetisiert.

Die IL-12 Produktion wird gehemmt durch: IL10, TGF- β , IL4.

Die IL-12 Produktion wird gefördert durch: INF γ , GM-CSF.

Die nachfolgende Abbildung veranschaulicht diese Balance zwischen IL-4 und IL-12 (108).



Der IL-4 Effekt scheint dominant zu sein. IL-12 ist nicht fähig, IL-4 an der Hochregulation seiner Produktion zu hindern, IL-4 ist zumindest teilweise in der Lage, IL-12 an der Hochregulation der INF γ Produktion zu hindern (156, 157).

E. Regulation der IL-12 Produktion durch dendritische Zellen

Dendritische Zellen stellen eine IL-12 Quelle dar (93, 94, 167). Im Gegensatz zu infizierten Makrophagen erfolgt die Stimulation dendritischer Zellen zur Produktion von IL-12 wahrscheinlich durch die Interaktion mit T-Zellen während der Antigen-Präsentation (94, 172).

Einige rezente Studien zeigen die Fähigkeit dendritischer Zellen, IL-12 zu produzieren auf:

1. Anti-IL-12 blockiert die Fähigkeit von murinen dendritischen Zellen, naive T-Zellen zur Entwicklung in Richtung des Th1 Phänotyps zu veranlassen (94).
2. Durch Aufnahme von Mikropartikel-adsorbiertem Proteinantigen kommt es in murinen DC zu einer Induktion von IL-12 p40/p35 mRNA (166).
3. Kang et al. zeigten, daß auch humane Langerhanszellen IL-12 produzieren (167)
4. Heufler et al. beobachteten, daß sowohl murine als auch humane dendritische Zellen ohne exogene Stimuli und vermehrt auf konventionelle Stimuli, wie z. B. *Staphylococcus aureus* IL-12 abgeben (93). Es wurden mRNA, Protein und Bioaktivität nachgewiesen.

Dendritische Zellen werden durch bakterielle Stimuli zur Produktion von IL-12 angeregt.

5. Die neuesten Untersuchungen von Koch et al. (165) ergaben, daß murine dendritische Zellen über die Interaktion mit T-Zellen IL-12 produzieren, auch ohne daß sie einen adäquaten antigenen Stimulus erhalten. Eine besondere Rolle spielen dabei

die Bindungen an CD40 und MHC-Klasse-II-Moleküle der dendritischen Zellen. Es wurde gezeigt, daß Bindungen an CD40 oder MHC-Klasse-II-Molekülen unabhängig voneinander IL-12 Produktion auslösen.

Der CD40 mediierte Weg zeigt, daß die IL-12 Produktion in dendritischen Zellen über die Interaktion mit aktivierten, CD40 Ligand exprimierenden T-Helferzellen induziert werden kann (165).

Vergleichende Untersuchungen ergaben, daß der CD40 mediierte Weg signifikanter ist, als die Induktion via MHC-Klasse-II-Moleküle. Die Wichtigkeit der Interaktion CD40/CD40 Ligand wird durch die Tatsache bekräftigt, daß Mäuse, denen es am CD40 Liganden fehlt, nicht in der Lage sind, eine Th1 Zell-mediierte Immunantwort auszulösen (165).

3. Migrationsmuster dendritischer Zellen in der Maus

Die migratorische Kapazität dendritischer Studien wurde schon in den vorhergehenden Abschnitten behandelt. Ich möchte in diesem Teil einige Studien nennen, die sich mit dem Wanderungsverhalten exogen zugeführter dendritischer Zellen im Mausmodell beschäftigt haben.

1. Kupiec-Weglinski et al. (173) beobachteten die Migration von gereinigten dendritischen Zellen aus der Milz und von T-Zellen in syngenen und allogenen Mäusen. Die Markierung der Zellen erfolgte mit ¹¹¹Indium-Tropolone. Nach intravenöser Applikation von radioaktiv-markierten Zellen kommt es sofort zu einer Ansammlung jener in den Lungen. Die aktive Migration erfolgt in Leber und Milz, wo zwischen 3 und 24 Stunden nach Applikation ein Gleichgewicht erreicht wird. DZ sind nicht in der Lage, aus dem Blutstrom in die Peyer'schen Plaques oder in mesenteriale bzw. periphere Lymphknoten einzuwandern. Dies wurde auch bei Verwendung von splenektomierten Mäusen beobachtet. In diesem Fall wandern die "Milz-suchenden" DC in die Leber, nicht in die Lymphknoten. Dendritische Zellen sind im Gegensatz zu T-Zellen nicht fähig, vom Blutstrom über die Lymphknoten in die Lymphe zu gelangen.

Eine weitere wichtige Entdeckung von Kupiec-Weglinski et al. ist die Tatsache, daß die Migration dendritischer Zellen vom Blutstrom in die Milz T-Zell-abhängig ist. Dendritische Zellen wanderten nicht in die Milzen von T-Zell-defizienten Nacktmäusen. Die DZ, die normalerweise in die Milz einwandern, wandern in diesem Fall in die Leber. Nach Rekonstitution mit T-Zellen war die Migration wieder mit jener in euthymischen Mäusen vergleichbar.

Außerdem verfolgten Kupiec-Weglinski et al. die Wanderung von radioaktiv-markierten DZ über die afferente Lymphe nach subkutaner Injektion in die Fußpfote. Die dendritischen Zellen akkumulierten in den poplitealen Lymphknoten und

wanderten nicht weiter in die inguinalen Lymphknoten. Es konnte weiters kein Unterschied zwischen euthymischen Mäusen und T-Zell-defizienten Nacktmäusen festgestellt werden. Diese Tatsache weist darauf hin, daß die Route über die Lymphgefäße in die Lymphknoten nicht T-Zell-abhängig ist (173).

2. Austyn et al. (26) zeigten im Anschluß an die Studien von Kupiec-Weglinski die Lokalisation von exogen applizierten dendritischen Zellen innerhalb der Milz. Die Zellen wurden zu diesem Zweck mit Fluorochrom markiert und intravenös appliziert. Die Milzen wurden 3 bzw. 24 Stunden nach dem Eingriff entfernt. Die dendritischen Zellen wurden innerhalb verschiedener Areale, die durch murine Antikörper und FITC-Anti-Immunglobulinen definiert wurden, visualisiert. Drei Stunden nach Applikation befand sich der Großteil der DZ in der roten Pulpa; nach 24 Stunden konnte die Mehrzahl der DZ in den T-Zell-abhängigen Arealen der weißen Pulpa nachgewiesen werden; sie werden wahrscheinlich zu interdigitierenden Zellen.

Austyn et al. entwickelten außerdem einen Assay mit Hilfe von Gefrierschnitten, um die Interaktion von DZ mit verschiedenen lymphoiden Elementen zu erforschen. Bei Inkubation von DZ auf Gefrierschnitten der Milz kommt es bei 37°C, nicht jedoch bei 4°C, zu einer spezifischen Bindung innerhalb der Marginalzone. Eine Bindung innerhalb der T-Areale konnte nicht beobachtet werden. Makrophagen zeigten nur innerhalb der roten Pulpa spezifische Bindungen, T-Zellen banden nicht.

DZ zeigten keine spezifischen Bindungen nach Inkubation auf Gefrierschnitten mesenterialer Lymphknoten, wohingegen T-Zellen bei 4°C endotheliale Venolen markierten. Es besteht die Vermutung, daß T-Zellen das vaskuläre Endothel in manchen Arealen verändern können, um so dendritischen Zellen den Eintritt vom Blutstrom in die Milz zu ermöglichen.

3. Die Studien von Moll et al. zeigten im Mausmodell, daß Langerhanszellen in der Leishmaniasis eine zentrale Rolle spielen. LZ internalisieren *Leishmania major* in der Haut und transportieren sie über die afferenten Lymphbahnen zu den regiona-

len Lymphknoten zur Initiation der spezifischen T-Zell-Immunantwort. Im Gegensatz dazu konnte diese Wanderung bei Verwendung von *L. major*-infizierten Makrophagen nicht beobachtet werden. Zur Visualisierung dieser Entdeckung verwendete die Arbeitsgruppe um Moll den fluoreszierenden, lipophilen Farbstoff PKH-26 zur Markierung der dendritischen Zellen. Die intrazellulären Parasiten wurden durch Inkubation der nodalen Zellen mit Acridinorange und Ethidiumbromid sichtbar gemacht (174).

4. Fragestellung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit zwei Teilaspekten der Funktion der dendritischen Zellen:

A: die adjuvante Funktion

B: die migratorische Funktion

Ein besseres Verständnis dieser Aspekte ist besonders im Hinblick auf einen künftigen Einsatz von dendritischen Zellen in der Klinik (z. B. Tumorthherapie) entscheidend wichtig.

A. Die adjuvante Funktion dendritischer Zellen

Die adjuvante Funktion dendritischer Zellen ist deren Fähigkeit, das prozessierte und an den MHC-Komplex gekoppelte Antigen spezifischen T-Zellen zu präsentieren und diese dadurch zu stimulieren.

IL-12 ist ein zentrales Zytokin, sowohl in der angeborenen als auch in der erworbenen Immunität. Es ist für die T-Zell-Stimulation, besonders für die Entwicklung von T-Helferzellen Typ 1 von Bedeutung

Die im folgenden aufgeführten Fragen, die in dieser Arbeit gestellt wurden, bauen auf rezente Studien auf, die zu einem guten Teil in unserem Labor erhoben wurden.

- # Im Maussystem fanden Koch et al. aus unserem Labor (165) eine Hochregulation von IL-12 auf die Stimulierung des CD40 Moleküls. Sind diese Beobachtungen auch im Humansystem zutreffend?
- # Kommt es auch im Humansystem zu einer Steigerung der IL-12 Produktion durch Stimulierung des MHC-Klasse-II Moleküls, wie Koch et al. (165) dies im Mausexperiment beschrieben haben?
- # Welche Auswirkungen hat der T-Zellkontakt auf die IL-12 Produktion dendritischer Zellen?

Im Mausystem wurde die IL-12 Produktion als Antwort auf T-Zellkontakt von Heufler et al. beschrieben (93)

- # Heufler et al. (93) beobachteten, daß DZ spontan und -vermehrt- auf bakterielle Stimuli IL-12 bilden. Welche Abhängigkeiten zeigt diese Stimulierbarkeit?
- # Ist diese Fähigkeit differentiell ausgebildet in Abhängigkeit vom Reifegrad?

B. Die migratorische Funktion dendritischer Zellen

Austyn (26) und Kupiec-Weglinski (173) beschrieben in ihren Arbeiten die Migrationsmuster intravenös oder subkutan applizierter muriner dendritischer Zellen in der Maus.

Über die Migrationsmuster von gezüchteten humanen dendritischen Zellen, also derjenigen dendritischen Zellen, deren klinischer Einsatz erwogen wird, ist praktisch nichts bekannt.

- # Welche Wanderungseigenschaften zeigen humane dendritische Zellen im Mausystem, also in einem xenogenen System?
- # Ist dieses Tiermodell zum Studium der Migration humaner dendritischer Zellen geeignet?