

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Entwicklung und Reifung der dendritischen Zelle aus Vorläufern im peripheren humanen Blut

Ebner, Susanne

1998

1. Einleitung

1. Einleitung

1.1. Das System der dendritischen Zellen

1.1.1 Entdeckung und Charakterisierung

Dendritische Zellen wurden erstmals 1973 von Steinman und Cohn aus Mäusemilzen isoliert (Steinman und Cohn, 1973). Anfänglich wurden sie als spezialisierte Makrophagen angesehen und verdanken ihren Namen ihrer charakteristischen Morphologie. Besonders ausgeprägt ist dieses dendritische Erscheinungsbild bei den Langerhanszellen, den dendritischen Zellen der Haut.

Die Identifikation der dendritischen Zellen erfolgt durch eine Kombination von

- morphologischen (Steinman und Cohn, 1973; Schuler et al., 1991)
- phänotypischen (Freudenthal und Steinman, 1990; Romani et al., 1991) und
- funktionellen (Steinman, 1991; Stingl und Shevach, 1991, Banchereau und Steinman, 1998) Merkmalen.

Gewebeständige dendritische Zellen zeigen Fortsätze mit rundem Querschnitt, die Zellorganellen beinhaltet. In Kultur ist das Verhalten und die Morphologie dendritischer Zellen einzigartig. Ihre segelartigen Zytoplasmaausstülpungen (die sogenannten „veils“) verleihen ihnen ein sonnenartiges Aussehen (Abb.1). Diese Ausläufer enthalten keine Zellorganellen und werden ständig ausgestülpt und wieder retrahiert.

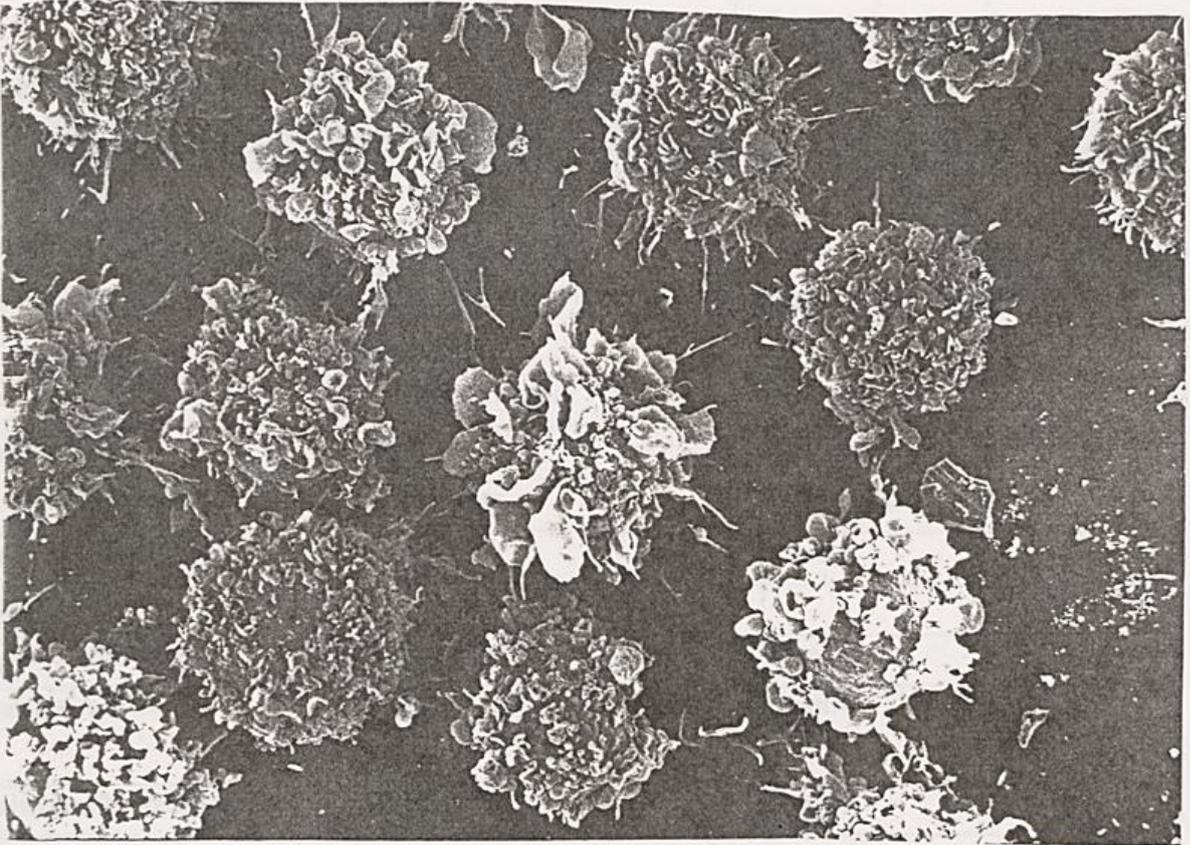


Abb.1: Rasterelektronische Aufnahme von unreifen und reifen dendritischen Zellen aus dem peripheren Blut. (Fotographie von Dr. K. Pfaller, Institut für Histologie, Universität Innsbruck)

Typische Makrophagenmarker wie unspezifische Esterase, Oberflächen-ATPase, CD14, F4/80 Makrophagenmarker werden nicht oder nur sehr schwach auf dendritischen Zellen exprimiert. Dieses Markerprofil weist auf die speziellen immunologischen Aufgaben der dendritischen Zellen hin und unterscheidet sie weitgehend vom Monozyten/Makrophagen-System (Tab.1).

Dendritische Zellen sind die einzigen Zellen, die die Fähigkeit besitzen, naive T-Zellen, d. h. bisher nie mit Antigen in Berührung gelangte T-Zellen, zu aktivieren. Nur sie sind in der Lage, eine primäre Immunantwort auszulösen. Durch diese wichtige Eigenschaft unterscheiden sich die dendritischen Zellen von andern Antigen-präsentierenden Zellen wie Makrophagen und B-Zellen, die als Prototyp der Antigen-präsentierenden Zellen angesehen wurden und von humanen venulären Endothelzellen, die in bestimmten Situationen ebenfalls als Antigen-präsentierenden Zellen dienen können. Diese Zellen können nur bereits sensibilisierte T-Zellen aktivieren und spielen so in der primären Immunantwort keine Rolle.

Tab.1: Vergleiche zwischen dendritischen Zellen und Makrophagen. Modifiziert aus:
Principles of Cellular and Molecular Immunology, Austyn JM, Wood KJ

Vergleiche zwischen dendritischen Zellen und Makrophagen		
Eigenschaften	Dendritische Zellen	Makrophagen
Cytologie		
Form	aktive Formation von Dendriten, sog. „veils“	sessil, rund, „spiegeleierförmig“
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 (im unreifen Zustand positiv)	positiv
Alkalische Phosphatase	negativ	positiv
Adhärenz		
In Kultur	schwach oder fehlend	stark
Endozytose		
Phagozytose	schwach oder nicht phagozytisch	aktiv-phagozytisch
Pinozytose	sehr aktiv (Makropinozytose)	aktiv
Membranproteine		
Zelllinien-spezifisch	33D1; NLDC145/DEC-205; N418/CD11c	F4/80, CD14
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)

Man muß jedoch beachten, daß die angegebenen Eigenschaften der dendritischen Zellen in Abhängigkeit ihres Reifungsgrades variieren, zum Beispiel 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, (siehe Kapitel „Die Reifung der dendritischen Zellen“).

Dendritische Zellen exprimieren eine große Anzahl von MHC Klasse I Molekülen und konstitutiv MHC Klasse II Moleküle auf ihrer Zelloberfläche. Genauso werden verschiedene Adhäsionsmoleküle wie z. B. ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1, CD54), LFA-3 (Leukocyte-function-associated antigen-3, CD58) und PECAM-1 (CD31) exprimiert. Weiters werden Moleküle mit kostimulatorischer Funktion bei der T-Zellaktivierung exprimiert, wie B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86). In Tab.2 sind charakteristische Marker von unkultivierten dendritischen Zellen aus dem Blut sowie von unreifen und reifen dendritische Zellen, gewonnen aus Monozyten aus dem peripherem Blut, im Vergleich mit Makrophagen und aktivierten B-Lymphozyten aufgezeigt.

Tab.2: Einige charakteristische Antigene, die die Differenzierung von humanen dendritischen Zellen beschreiben; hier im Vergleich mit Makrophagen und aktivierten B-Zellen. Beurteilung der Expression der Antikörper erfolgte nach folgendem Schlüssel: -, negativ; ±, variabel; +, positiv; ++, stark positiv; +++, extrem stark; () nur eine positive Subpopulation. Na = not available. * = über Nacht oder länger in Gegenwart von Serum kultiviert, §= bis jetzt erst Daten aus der Maus. Modifiziert nach D. N. J. Hart, 1997.

Antigen/Molekül	Frisch isolierte Blut-DCs, unreife DCs	Reife DCs aus dem Blut	Unreife DCs aus Monozyten des Bluts	Reife DCs aus Monozyten des Bluts	Makrophagen	Aktivierte B-Zellen
Dendritische Zellen						
CMRF-44	(+)	+++	±	++	(+)	++
CMRF-54	-	++	-	++	(+)	(+)
CD83	-	+	-	++	-	(+)
DEC-205§	Na	++	Na	Na	±	±
S100	Na	++	±	+	Na	-
Makrophagen						
CD14	-	-	±	-	+	±
CD68	+	+	+++	++	++	-
CD115	-	-	++	-	+	-
Myeloide/lympoide						
CD1	-	-	-	++	(+)	-
CD4	+	±	+	+	+	-
CD5	+	++	+	++	+	(+)
CD13	+	+	+	+	±	
CD33	+	+	+	+	±	-
Fc-Rezeptoren						
CD64	±	-	++	±	++	-
CD32	+	±	++	±	++	+
CD16	-	-	(+)	-	+	-
Adhäsionsmoleküle						
CD11a (LFA-1)	++	++	++	++	+	++
CD11b	-	(+)	++	++	+	-
CD11c	±	++	+	+	+	(+)
ICAM-1 (CD54)	+	+++	+	+++	+	+++
ICAM-2 (CD50)	+	+	+	+		
ICAM-3 (CD 102)	+++	+++	+	+	-	+
LFA-3 (CD58)	++	++	++	++	++	++
Kostimulatorische						
CD40	±	++	+	++	+	++
CD80	-	++	-	++	+	++
CD86	-	++	±	+++	+	++
Leukozytenmoleküle						
CD45RA	+	±	+	±	-	-
CD45RO	-	++	-	++	+	++
MHC						
HLA-ABC	++	+++	+	+++	++	++
HLA-DP	+	+++	+	+++	++	++
HLA-DQ	++	+++	+	+++	++	++
HLA-DR	++	+++	+	+++	++	++

1.2.1 Herkunft und Vorkommen

Es gibt zwei Typen von dendritischen Zellen, die verschiedene Eigenschaften und Funktionen haben. Die interdigitierenden dendritischen Zellen, meist einfach nur „dendritische Zellen“ genannt, stammen direkt von Knochenmarksvorläufern ab und haben gemeinsame Vorläufer mit Monozyten/Makrophagen und Granulozyten (Abb.2). Ein weiterer Entwicklungsweg über eine Vorläuferzelle, die sowohl T-Zellen, als auch dendritische Zellen hervorbringen kann, wurde kürzlich beschrieben. Den zweiten Typ von dendritischen Zellen nennt man folliculäre dendritische Zellen, weil sie in den Keimzentren der Lymphfollikel in den Lymphknoten, der Milz und dem Mukosa-assoziierten Lymphgewebe vorkommen. Folliculäre dendritische Zellen stammen nicht direkt vom Knochenmark-Zellvorläufern ab und sind nicht mit den interdigitierenden dendritischen Zellen verwandt.

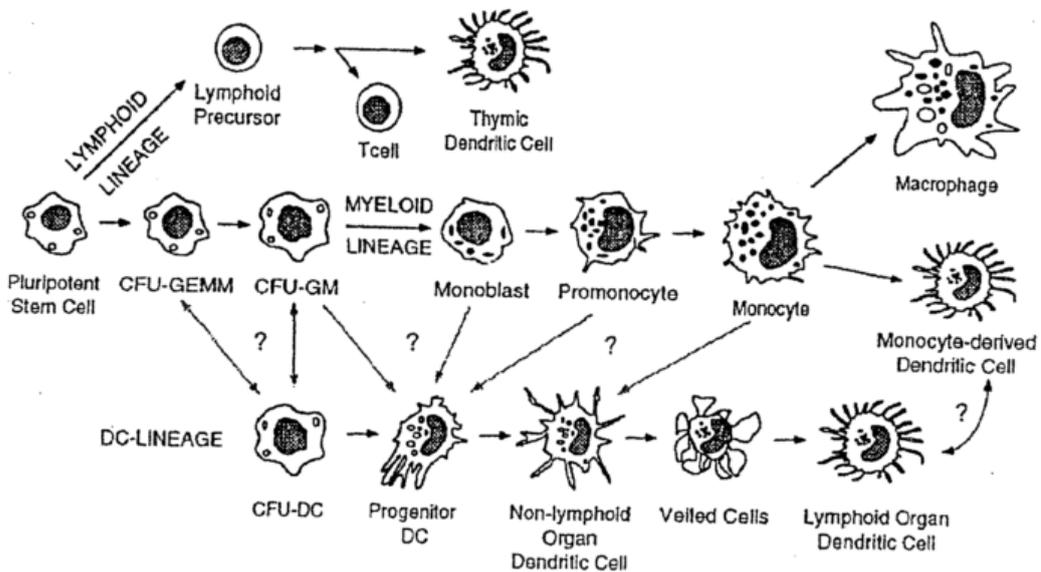


Abb.2: Mögliche Abstammung und Entwicklung von dendritischen Zellen. Aus Lutz et al., 1996.

Seit ihrer erstmaligen Beschreibung wurden dendritische Zellen in beinahe allen Geweben gefunden, wobei sie je nach Lokalisation unterschiedliche Phänotypen haben und verschiedene Funktionen erfüllen.

Tab.2: Vorkommen der dendritischen Zellen im Gewebe

Kompartiment	Nomenklatur	Lokalisation
nicht-lymphatische Organe	Langerhanszellen Dermale dendritische Zellen Interstitielle dendritische Zellen	Epidermis, Schleimhäute Dermis Herz, Lunge, Niere, Leber, Darm
Zirkulation	DC der afferenten Lymphe „veiled cells“ Blut-dendritische Zellen	afferente Lymphe peripheres Blut
Lymphatische Organe	interdigitierende Zellen dendritische Zellen	T-Zell-Arcale der sekundären lymphatischen Gewebe (Lymphknoten, Tonsillen, Peyer'sche Plaques), Medulla des Thymus marginale Zone der Milz

1.2.1 Die Funktion der dendritischen Zellen während der Immunantwort

Die Aufgaben und Fähigkeiten der dendritischen Zellen sind vielfältig. Sie sind die wichtigsten Induktoren der Immunabwehr, da sie als einziger Zelltyp in der Lage sind, naive T-Zellen zu stimulieren. Die drei verschiedenen Funktionsbereiche sind auch zeitlich getrennt (Steinman, 1991, Banchereau und Steinman, 1998).

Die Wächterfunktion

Unreife dendritische Zellen aus den nicht-lymphatischen Geweben sind aufgrund ihrer Fähigkeiten zur Endozytose in der Lage, fremde Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und zu präsentieren. Durch Makropinozytose und Rezeptor-vermittelte Aufnahme (Sallusto et al., 1995) können Moleküle und durch Phagozytose können ganze Mikroorganismen (Austyn, 1996) von den Zellen aufgenommen werden. 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 (Kleijmeer et al., 1994, Pieters, 1997). Diese Annahme wird bestärkt von der Tatsache, daß mit Abnahme der Endosomen im Zuge der Reifung die Prozessierungspotenz der LCs rückläufig ist (Stössel et al., 1990). In umgekehrter Weise verhält sich die Syntheserate der MHC-II-Moleküle (Puré et al., 1990; Kämpgen et al., 1991; Cella et al., 1997).

Die prozessierten Peptide werden nach der Koppelung an MHC-Moleküle an der Zelloberfläche T-Lymphozyten präsentiert.

Die migratorische Funktion

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

Die mit Antigen „beladenen“ DCs wandern anschließend über die afferenten Lymphgefäße in die parakortikalen T-Zellareale der Lymphknoten, wo sie die T-Zellen auffinden, die spezifisch zu ihnen passen und in der Lage sind, Immunität zu induzieren. Die für die Wanderung benötigten Adhäsionsmoleküle werden de novo oder verstärkt exprimiert und verbessern die Migrationsfähigkeit der Zellen effizient. Im Zuge der Wanderung verlieren die DCs ihre Fähigkeit Antigen zu prozessieren und verstärken ihre

Fähigkeit Antigen zu präsentieren. Die in den Lymphknoten angelangten reifen dendritischen Zellen sind ident mit den interdigitierenden Retikulumzellen.

Die adjuvante Funktion

Die dendritischen Zellen werden als Adjuvans der Natur (Steinman, 1991) bezeichnet, da sie in der Lage sind primäre Immunantworten auszulösen.

Die Migration der DCs in die Lymphknoten ist notwendig, weil nur dort eine realistische Chance besteht, die für die jeweiligen MHC/Peptid-Komplexe spezifischen T-Zellklone zu finden. Sind die T-Zellen stimuliert, proliferieren sie und produzieren Zytokine. Die Aktivierung der passenden T-Zellen erfolgt in drei Schritten (Steinman und Inaba, 1989).

1. Reife dendritische Zellen, wie sie nach der Migration in den Lymphknoten zu finden sind, sind fähig, ruhende T-Zellen in einer Antigen-**unabhängigen** Weise in relativ stabilen aber reversiblen Aggregaten zu binden (Inaba et al., 1986; Inaba et al., 1989). 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 bekannt. Wahrscheinlich spielt die Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle im Rahmen des Reifungsprozesses der dendritischen Zellen eine Rolle. Das Antigen-unspezifische „clustering“ kann nur bei reifen dendritischen Zellen und nicht bei anderen APC beobachtet werden (Feudenthal und Steinman, 1990; Romani et al., 1989; Teunissen et al., 1990; Inaba und Steinman, 1989).
2. Nach erfolgreicher Suche nach dem passenden T-Zellrezeptor erfolgt nun als nächster Schritt die Antigen-**spezifische** DC-T-Zell-Bindung zwischen MHC II/Peptidkomplex und dem spezifischen T-Zell-Rezeptor. Biochemische und molekularbiologische Studien zeigen, daß APCs nur eine geringe Anzahl von streng definierten immunologisch wirksamen Peptiden präsentieren und zusätzlich eine große Zahl Peptide von größerer Variationsbreite (Germain, 1991; Rudensky et al., 1991). Eine APC, insbesondere eine DC 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 das Ausreichen einer geringen Anzahl hin (Romani et al., 1989; Demotz et al., 1990).

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

3. Für die T-Zell-Proliferation sind weiterhin noch **kostimulatorischen** Signale nötig, die von den DCs gebildet werden (Steinman und Young, 1991). Diese Signale sind biochemisch nicht vollständig identifiziert (Mueller et al., 1989). Für das B7-1 (CD80)-Molekül, das auf reifen DCs exprimiert wird (Symington et al., 1993; Young et al., 1992), wurde eine kostimulatorische Funktion nachgewiesen (Koulova et al., 1991; Reiser et al., 1992). Das gilt auch für das B7-2 (CD86)-Molekül (Inaba et al., 1994; Engel et al., 1994; Lanier et al., 1995; Enk und Katz, 1994).

1.2. Die Reifung der dendritischen Zellen

Die Reifung der dendritischen Zellen wurde anfänglich mit epidermalen Langerhanszellen als Modell beschrieben (Schuler und Steinman, 1985). Dieser Reifungsprozess wurde inzwischen auch für andere Typen von DCs beschrieben, z. B. für Blut-dendritische Zellen.

Nachdem sich die dendritischen Zellen aus Vorläufern aus Knochenmark oder Thymus entwickelt haben, wandern die DCs in verschiedene lymphatische und nicht-lymphatische Gewebe und Organe. Dort ruhen sie als **unreife** dendritische Zellen („**early stage**“). Sie werden als unreif bezeichnet, weil sie noch einige Monozyten/Makrophagen-Marker exprimieren, wie z. B. Fc- (CD32) und Komplement-Rezeptor (iC3b, CD11b) (Stingl et al., 1977), F4/80-Makrophagenantigen, Membran-ATPasen, unspezifische Esterasen (Schuler und Steinman, 1985), endogene Peroxidasen und dem Rezeptor für Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF, CD115) (Takashima et al., 1995). Ein weiteres Kennzeichen der DCs ist eine konstitutive Expression von MHC-Klasse II, die im Zuge der Reifung verstärkt wird (Schuler, 1991). Als Beispiele für unreife dendritische Zellen in nicht lymphatischen Geweben sind die Langerhanszellen der Epidermis und der Schleimhäute, die dermalen dendritischen Zellen und die interstitiellen dendritischen Zellen in Herz, Lunge, Niere, Leber und Darm zu nennen.

Als Antwort auf bestimmte Stimuli, wie z. B. Eindringen von Bakterien, Reizung durch Kontaktallergene etc., wird ein Prozess eingeleitet, der dadurch gekennzeichnet ist, daß DCs sehr schnell eine ungeheuer große Kapazität entwickeln, um native Protein-Antigene zu prozessieren (effiziente Antigenaufnahme, massive MHC Biosynthese, Anwesenheit von Prozessier-Organellen, wie MHC-Klasse II beinhaltende Vesikel – MIIC's (Pierre et al., 1997)). Die DCs sind immer noch unreif aber funktionell sehr aktiv; sie befinden sich in einer Art Zwischenstadium („**intermediate stage**“). Frisch isolierte (z. B. trypsinisierte) epidermale Langerhanszellen sind der Prototyp diese Stadiums.

Die dendritischen Zellen wandern nun via afferente Lymphe ins lymphatische Gewebe. Der Differenzierungsprozess der Zellen geht weiter und führt zu **reifen** dendritischen Zellen („**late stage**“) (Abb.3). Diese sind charakterisiert durch geringe Kapazität für Antigenaufnahme und Antigenprozessierung aber durch eine stark erhöhte Funktion, um T-Zellen zu sensibilisieren. Inflammatorische Stimuli, wie die Zytokine TNF- α und IL-1 β induzieren die vorher beschriebenen Vorgänge (Kämpgen et al., 1991;

Puré et al., 1990) und den „transient boost“ der Biosynthese von MHC-Klasse II Molekülen (Cella et al., 1997). Diese Zytokine sind auch für das Abschalten der Makropinozytose (Sallusto et al., 1995) verantwortlich.

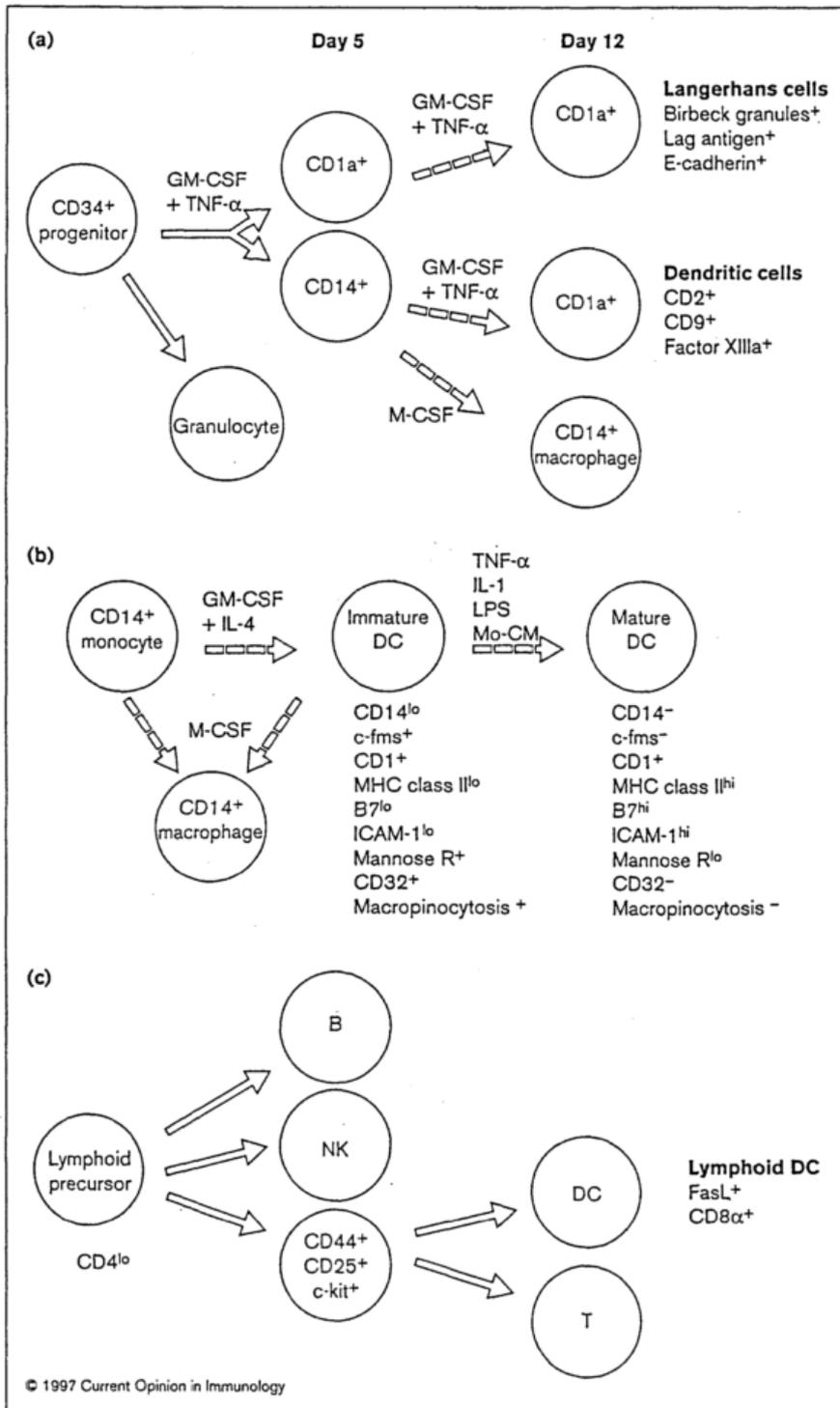


Abb.3: Herkunft und Reifung der dendritischen Zellen. Aus Cella et al., 1997.

1.2.1 Die Regulation der Reifung durch Zytokine

In vivo können die zellulären Quellen der Reifungs-induzierenden Zytokine unterschiedliche Zelltypen sein, die in räumlicher Nähe zu den dendritischen Zellen liegen. Zum Beispiel ist in der Haut bekannt, daß Keratinozyten in Antwort auf ein Gefahrensignal wie kontaktsensibilisierende Applikationen, TNF- α und IL-1 β sezernieren. Andererseits wird IL-1 β von den dendritischen Zellen selbst gemacht (Enk und Katz, 1992, Heufler et al., 1992). Auch die Phagozytose von Bakterien oder die Aufnahme von bakteriellen Produkten (LPS) löst die Produktion von inflammatorischen Zytokinen in DCs aus wie IL-1 β (Henderson et al., 1997; Granucci et al., 1994; Kanangat et al., 1995), TNF- α (Henderson et al., 1997; Thurnher et al., 1997) und IL-6 (Riva et al., 1996). So können DCs, die infiziert wurden oder sich in bakteriell kontaminierten Milieu befinden, autokrin die Reifung auslösen und Immunität induzieren.

Kürzlich wurden zwei Moleküle beschrieben, die eine kritische Rolle bei der Reifung und beim Überleben der dendritischen Zellen spielen. TRANCE (TNF-related activation-induced cytokine) wird von T-Zellen produziert und verhindert eine Apoptose der DCs (Wong et al., 1997). RANK (receptor activator of NF- κ B), ein Homolog zum TNF-Rezeptor und CD40 wird auf dendritischen Zellen exprimiert und die Bindung an seinen Liganden (RANKL) steigert die immunostimulatorischen Fähigkeiten für naive T-Zellen (Anderson et al., 1997).

Ein wichtiger Gegenspieler der Reifung von DCs ist IL-10 (De Smedt et al., 1997). Dieses Zytokin verhindert die vermehrte Expression von kostimulatorischen Molekülen auf dendritischen Zellen. Dendritische Zellen, die mit IL-10 inkubiert wurden, induzieren keine Proliferation in CD4⁺ T-Zellen und TH₁ Klonen sondern Anergie (Steinbrink et al., 1997; Takenaka et al., 1997). Steinbrink et al. (1997) zeigte, daß vollständig ausgereifte DCs auf die Effekte des IL-10 nicht mehr ansprechen. Ein anderes Zytokin das hemmenden Einfluß auf die Reifung der DCs hat, scheint TGF- β zu sein (Yamaguchi et al., 1997).