

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h.c. G. Plewig

Experimentelle Untersuchungen zur zellbiologischen Charakterisierung
Inflammatorischer Dendritischer Epidermaler Zellen
in entzündlich veränderter Epidermis

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Martina Moderer
aus Marburg/Lahn
2002

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. med. Andreas Wollenberg
Mitberichterstatter:	PD Dr. Th. Sitter
	PD Dr. A. Schirren
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	11.07.2002

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	Seite
1.1	Konzept der dendritischen Zellen	1
1.2	Definition und Funktion von Langerhans Zellen	1
3.1	Definition und Funktion von Inflammatorischen Dendritischen Epidermalen Zellen (IDEC)	3
1.4	Zellzyklus epidermaler dendritischer Zellen	3
1.5	Fragestellung	5
2.	Material und Methodik	
2.1	Gewinnung des biologischen Untersuchungsmaterials	6
2.2	Präparation epidermaler Zellsuspensionen	6
2.3	Immunphänotypisierung epidermaler Zellsuspensionen	7
2.4	Durchflußzytometrische Analyse der Zellsuspensionen	8
2.5	Kultur dendritischer Zellen aus Monozyten des peripheren Blutes (MoDC)	9
2.6	Anreicherung epidermaler Langerhans Zellen	9
2.7	Durchflußzytometrische DNA-Analyse	10
2.8	Die gemischte Haut-Lymphozytenreaktion (SMLR)	11
3.	Ergebnisse	
3.1	Immunphänotypisierungen monozytärer und Inflammatorischer Dendritischer Epidermaler Zellen	13
3.1.1	Der Immunphänotyp unreifer MoDC entspricht weitgehend dem Immunphänotyp der IDEC, nicht jedoch dem der LC	13
3.1.2	Der Immunphänotyp der IDEC ist teils diagnoseabhängig moduliert, teils diagnoseunabhängig konstant	16
3.1.3	Eine 6-tägige Kulturdauer mit Interleukin-4 und GM-CSF ergibt eine stärkere CD1a-Expression von MoDC als eine 4-tägige Kulturdauer	17
3.1.4	Interleukin-13 und GM-CSF bewirken eine Ausreifung von Monozyten zu MoDC	18

3.1.5	Zugabe von autologem Serum in die Kultur mit Interleukin-4 und GM-CSF hemmt die Ausreifung von Monozyten zu MoDC	19
3.2	Zellzyklusuntersuchungen	20
3.2.1	Etablierung einer durchflußzytometrischen Methode zur Untersuchung des Zellzyklus epidermaler Zellsuspensionen	20
3.2.1.1	Die gemischt logarithmisch/lineare Datenerfassung zur DNA-Analyse gemischter Zellpopulationen	20
3.2.1.2	Sheath-fluid verändert die Fluoreszenzintensität	20
3.2.1.3	Fluoreszenzintensität ist abhängig von der Lagerung der SYTOX-Lösung	22
3.2.1.4	Fluoreszenzintensität SYTOX-Green gefärbter Zellsuspensionen ist abhängig von der eingesetzten Zellzahl im Volumen	23
3.1.1.1	Vitalfärbung mit 7AAD kann tote Zellen von der Zellzyklusanalyse ausschließen	24
3.2.1.6	Fixierung mit Paraformaldehyd ist Ethanol überlegen	25
3.1.2	Das U937/MOLT4 Zellgemisch ist ein geeignetes Modell für dendritische Zellen in epidermalen Zellsuspensionen	25
3.2.3	Wenige Keratinozyten treten in normaler Haut in den Zellzyklus ein	28
3.2.4	Wenige Langerhans Zellen treten in normaler Haut in den Zellzyklus ein	29
3.2.5	Die Zellteilungsrate der Keratinozyten ist in entzündlicher Haut erhöht	30
3.2.6	Langerhans Zellen und IDEC teilen sich in entzündlicher Haut	31
3.3	Funktionelle Untersuchungen epidermaler dendritischer Zellen	33
4.	Diskussion	35
4.1	Der Immunphänotyp der IDEC entspricht weitgehend dem der MoDC	36
4.2	Einordnung der eigenen Methodik der DNA -Untersuchungen	39
4.3	Teilen sich LC und IDEC innerhalb der Epidermis ?	41
4.4	Epidermale dendritische Zellsuspensionen stimulieren autologe Lymphozyten	43
5.	Zusammenfassung	44
6.	Literatur	46
7.	Anhang	51
7.1	Kulturmedien und Lösungen	51
7.2	Antikörper und Seren zur Bestimmung der Rezeptor-Expressionen	54

8. Danksagung	56
9. Lebenslauf	57

Abkürzungsverzeichnis

7AAD	7-Amino-actinomycin D
AK	Antikörper
CD	Cluster of differentiation
DDM	Doublettdifferenzierungsmodul
FITC	Fluoresceinisothiocyanat, ein Fluoreszenzfarbstoff
Fl1	Kanal der Grünfluoresznez in der durchflußzytometrischen Analyse
Fl2	Kanal der Orangefluoresznez in der durchflußzytometrischen Analyse
Fl3	Kanal der Rotfluoresznez in der durchflußzytometrischen Analyse
FSC	Kanal des Vorwärtsstreulichts in der durchflußzytometrischen Analyse
IDEC	Inflammatorische dendritische epidermale Zelle
IL	Interleukin
LC	Langerhans Zellen
MoDC	aus Monozyten hergestellte dendritische Zellen
PE	Phycoerythrin, ein Fluoreszenzfarbstoff
PFA	Paraformaldehyd
SMLR	Gemischte Haut-Lymphozyten Reaktion
SSC	Kanal des Seitwärtsstreulichts in der durchflußzytometrischen Analyse

1 Einleitung

1.1 Konzept der dendritischen Zellen

Fast alle Organe des menschlichen Körpers besitzen neben den organspezifischen Zellen weitere Zellen, die durch eine Oberflächenexpression von MHC Klasse II Molekülen, eine autonome Migrationsfähigkeit, eine dendritische Morphologie und ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation charakterisiert sind. Diese Zellen werden als dendritische Zellen bezeichnet [39].

Dendritische Zellen können auf unterschiedliche Weise aus dem Extrazellularraum lösliche Proteine aufnehmen. Dies geschieht unter anderem mittels Rezeptor-medierter Endozytose oder Makropinozytose [34]. Die so aufgenommenen Proteine werden proteolytisch in den Endosomen in Oligopeptide gespalten und auf MHC-Moleküle geladen und an der Zelloberfläche an T-Zellen präsentiert [1].

Dendritische Zellen sind, im Gegensatz zu anderen antigenpräsentierenden Zellen wie Monozyten, Makrophagen oder B-Lymphozyten, in der Lage, eine primäre Immunantwort einzuleiten. Hierunter versteht man eine Antwort auf solche Antigene, die dem Immunsystem bislang noch nicht bekannt waren.

Vor einigen Jahren wurde eine Technik angegeben, die aus Monozyten des peripheren Venenblutes die Generierung dendritischer Zellen ermöglicht. Die so erzeugten Zellen werden als 'monocyte-derived dendritic cells' (MoDC) bezeichnet [35].

1.2 Definition und Funktion von Langerhans Zellen

Der Medizinstudent Paul Langerhans entdeckte 1868 mittels einer Goldchloridfärbung eine neue Art von Zellen, die er als intraepidermal, vorwiegend suprabasal lokalisierte, dendritisch geformte Zellen beschrieb, und dem Nervensystem zurechnete [26]. Diese Zellen wurden in der Folgezeit als Langerhans Zellen (LC) bezeichnet und gelten, sicherlich mitbedingt durch ihre günstige Erreichbarkeit, als die am besten untersuchten Zellen der dendritischen Zellfamilie [52].

Langerhans Zellen machen in etwa 1-2% aller Epidermiszellen aus. Sie sind in einer Dichte von etwa $450/\text{mm}^2$ gleichmäßig über das gesamte Integument verteilt. An den Fußsohlen ($50/\text{mm}^2$) und dem Genitale ($300/\text{mm}^2$) ist die Dichte geringer [3]. Langerhans Zellen wurden auch in apokrinen Schweißdrüsen, Talgdrüsen und Haarfollikeln nachgewiesen [9, 19].

Langerhans Zellen sind ultrastrukturell durch ein klares Zytoplasma, einen gelappten Kern, das Fehlen von Desmosomen und Tonofilamenten, sowie die nur elektronenmikroskopisch

nachweisbaren Birbeck Granula charakterisiert. Diese tennisschlägerartigen intrazellulären Organellen sind das spezifischste Merkmal zur Identifikation von LC. Ein monoklonaler Antikörper, der ein Birbeck Granula-spezifisches Protein erkennt, wurde charakterisiert [20]. Die Funktion der Birbeck Granula ist unklar.

Langerhans Zellen exprimieren wie alle Zellen des menschlichen Körpers MHC Moleküle der Klasse I, sowie als einzige Zellen innerhalb der normalen Haut MHC-Moleküle der Klasse II an ihrer Oberfläche. Zur Identifizierung der LC wird am häufigsten das nicht-klassische MHC Molekül CD1a herangezogen, welches ursprünglich als Differenzierungsantigen für Thymozyten beschrieben wurde und sehr stark auf ruhenden LC exprimiert wird. Im Gegensatz zu dermalen dendritischen Zellen sind LC negativ für die Oberflächenmarker CD1b und CD1c.

Der Immunphänotyp frisch isolierter Langerhans Zellen ist gut untersucht. So exprimieren LC wenig CD11c, jedoch kein CD11a oder CD11b, sämtlich Integrin-Seitenketten. Auch die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sind auf LC nicht nachweisbar, werden allerdings im Verlauf der Kulturnahme aufreguliert [16, 45]. Die funktionelle Relevanz des von LC exprimierten Adhäsionsmoleküls E-Cadherin ist ebenfalls gut belegt [17]. Langerhans Zellen können verschiedene IgE-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche tragen. Eine Induzierbarkeit des niedrigaffinen IgE-Rezeptors FcεRII/CD23 durch Kultur wurde bereits 1989 beschrieben [6]. Die Expression des hochaffinen IgE-Rezeptor FcεRI ist seit 1992 bekannt [5, 44]. Als dritte IgE-bindende Struktur wurde ein monovalentes IgE-bindendes Lektin (εBP) auf Langerhans Zellen beschrieben [48].

Die Ontogenese der Langerhans Zellen ist unklar. Die Herkunft der Zellen aus dem Knochenmark, 1979 erstmals nachgewiesen [21], wird mittlerweile allgemein akzeptiert. Langerhans Zell-ähnliche Zellen können auf unterschiedliche Art und Weise in vitro hergestellt werden: CD34-positive Nabelschnurblutzellen exprimieren in Kultur mit GM-CSF und TNF-α CD1a und induzieren eine T-Zell-Proliferation [11]. Deshalb wird vermutet, daß sich unter dem Einfluß dieser Zytokine die CD34-positiven Stammzellen aus dem peripheren Blut, wie auch im Knochenmark, in vivo zu LC differenzieren können. Es gelingt jedoch auch aus CD14-positiven Monozyten des peripheren Venenblutes (PBMC) nach 6-8 Tagen in Kultur mit Interleukin-4, GM-CSF und TGF-β-haltigem Medium CD1a exprimierende Zellen herzustellen [18].

Um die kutanen Lymphknoten zu erreichen, können aktivierte LC die Epidermis verlassen und durch die Dermis zu den Lymphgefäßen wandern [24, 43]. Eine Sensibilisierung bleibt bei einer Durchtrennung der regionären Lymphgefäße aus, da erst in den lymphatischen

Organen eine Sensibilisierung und Proliferation der T-Zellen erfolgt [40]. Es ist jedoch berichtet worden, daß bereits in der Kutis zwischen LC und sensibilisierten T-Zellen Interaktionen im Sinne einer sekundären Immunantwort stattfinden [38].

Während dieser Wanderung ändern die unreifen LC ihren Phänotyp und wandeln sich zu reifen dendritischen Zellen aus. Diese Ausreifung wird durch eine Kultur nachvollzogen. So vermindern LC ihre Expression von CD1a und verlieren ihre Birbeck-Granula. Stattdessen werden verschiedene Adhäsionsmoleküle und MHC-Moleküle aufreguliert [33]. Strukturen, die wichtig für die Antigenpräsentation sind, werden also verstärkt gebildet [4].

1.3 Definition und Funktion von Inflammatorischen Dendritischen Epidermalen Zellen (IDEC)

Während LC in normaler Haut die einzige CD1a-positive Zellpopulation darstellen, lassen sich in entzündlich veränderter Haut mehrere CD1a-positive Subpopulationen abgrenzen. Als Inflammatorische Dendritische Epidermale Zellen (IDEC) wird eine zweite, epidermale CD1a-positive Zellpopulation bezeichnet, die sich immunphänotypisch und ultrastrukturell von den klassischen LC unterscheidet [51]. IDEC sind als eine epidermal lokalisierte, CD1a-positive, CD11b-positive Zellpopulation definiert, die keine Birbeck Granula enthalten [52]. Im Gegensatz zu LC finden sich IDEC generell nur in entzündlich veränderter, nicht jedoch normaler Haut [51, 54].

Seit 1986 ist bekannt, daß CD1a-positive epidermale, dendritisch geformte Zellen in Läsionen des atopischen Ekzems IgE-Moleküle auf der Zelloberfläche tragen [10]. Untersuchungen mit durchflußzytometrischer Methodik konnten jedoch zeigen, daß IDEC und nicht LC die relevante IgE-tragende Zellpopulation bei atopischem Ekzem darstellen [54]. Diese Untersuchungstechnik, die eine quantitative Rezeptordichtenbestimmung aus limitiertem Biopsiematerial ermöglicht, wird als Langerhans-Zell-Phänotypisierung [53] oder im englischen Schrifttum als epidermal dendritic cell phenotyping bezeichnet [54]. Sie beruht auf einer Kombination von indirekter Dreifarbenfluoreszenzfärbung und quantitativer durchflußzytometrischer Analyse und wird später genauer beschrieben werden (2.2 bis 2.4).

1.4 Zellzyklus epidermaler dendritischer Zellen

Der normale Zyklus einer Zelle läuft in Phasen ab. Er beginnt mit der diploiden postmitotischen Ruhephase (G1/G0) unter kontinuierlicher Erhöhung der RNA- und Proteinsynthese. Es folgt die S-Phase, in der die DNA verdoppelt wird (Reduplikation) und tetraploid wird. Der dritte Schritt besteht aus der prämitotischen Ruhephase, einer relativ

kurzen Periode vor der nächsten Teilung. Die M-Phase bezeichnet die Mitose, während der die Zelle ihren Chromosomensatz halbiert. Daraus entstehen dann zwei Tochterzellen. Nach Abschluß der Mitose treten die Zellen entweder in eine neue G1-Phase ein oder sie bleiben in einer G0-Phase (Interphase) ohne weitere Teilung [25]. Obwohl gezeigt werden konnte, daß einzelne LC innerhalb der Epidermis in die Mitose eintreten [12, 13], ist die Relevanz dieser Beobachtung für die physiologische Besiedlung der Haut mit LC noch unklar.

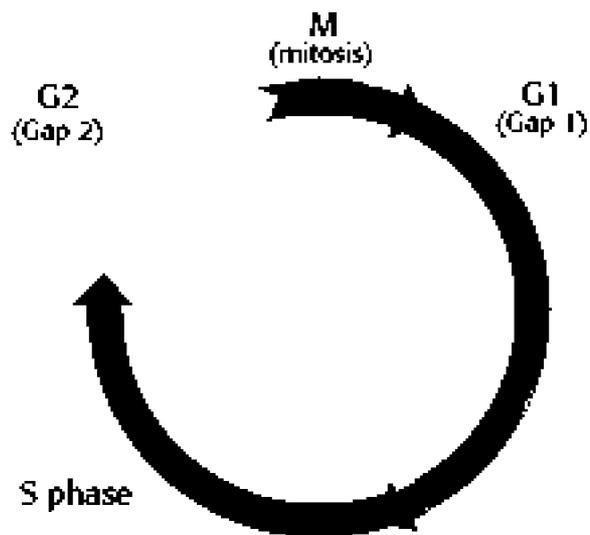


Abb.1: Zellzyklus eukaryotischer Zellen

Verschiedene Phasen des Zellzyklus und der Zellteilung; in der postmitotischen Ruhephase (G1/G0) sind die Zellen diploid, es folgt die DNA-Reduplikation in der Synthese-Phase (S), danach die prämitotische Ruhephase (G2) mit anschließender Mitose (M).

1.5 Fragestellung

Übergeordnete Zielsetzung dieser Arbeit war es, die IDEC innerhalb der entzündlichen Haut im Vergleich zu LC und MoDC mit verschiedenen Untersuchungstechniken näher zu charakterisieren. Im einzelnen wurden folgende Fragen gestellt:

1. Lassen sich durch Kultur von Monozyten in einem definierten Milieu dendritische Zellen generieren, die phänotypische Charakteristika der IDEC aufweisen?
2. Wie ändert sich der Immunphänotyp dieser MoDC nach Kulturnahme mit Interleukin-4 (IL4), Interleukin-13 (IL13) oder Humanserum?
3. Kommt es im entzündlichen Mikromilieu in loco zu einer vermehrten Zellteilung von LC oder IDEC, die die Vermehrung innerhalb der entzündlichen Haut beim atopischen Ekzem erklären können?
4. Spielt die Expression kostimulatorischer Moleküle auf LC und IDEC eine Rolle bei der immunstimulatorischen Funktion dieser Zellen?

Hierzu wurden Immunphänotypisierungen der Oberflächenantigene auf LC, IDEC und MoDC durchgeführt. Weiterhin wurde es nötig, eine durchflußzytometrische Methode zur Zellzyklusanalyse gemischter Zellpopulationen zu etablieren. Diese Methode zur DNA-Messung sollte zunächst an Zelllinien erprobt werden, um dann später auf normale und entzündliche Haut übertragen zu werden. Schließlich wurde eine gemischte Haut-Lymphozytenreaktion zur funktionellen Untersuchung der epidermalen dendritischen Zellen durchgeführt.

2 Material und Methodik

2.1 Gewinnung des biologischen Untersuchungsmaterials

Die im folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. med Dr. h.c. G. Plewig) durchgeführt. Zur Untersuchung gelangten Blutproben und Hautproben von Patienten mit unterschiedlichen entzündlichen Hauterkrankungen, sowie Blut von hautgesunden Probanden. Sämtliches biologisches Material wurde, wie von der zuständigen Ethikkommission begutachtet, nach entsprechender schriftlicher und mündlicher Aufklärung mit schriftlichem Einverständnis der Patienten gewonnen und noch am selben Tag aufgearbeitet.

Zur Etablierung der durchflußzytometrischen Analyseverfahren des Zellzyklus wurden die Zelllinien U937 und MOLT4 verwendet [23].

Außerdem wurden in Kooperation mit dem Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. W. Eisenmenger) Spalthautentnahmen mit einem Dermatome an der Oberschenkelrückseite von Leichen durchgeführt. Die so gewonnenen epidermalen Zellsuspensionen wurden für die durchflußzytometrischen Zellzyklusanalysen (2.7) eingesetzt.

2.2 Präparation epidermaler Zellsuspensionen

Sämtliche Hautproben wurden unter sterilen Bedingungen in einer Werkbank zuerst in einer Petrischale in PBS (Anhang 7.1) mechanisch gereinigt, dann mit der Epidermis nach unten in den Deckel der Petrischale transferiert. Fettgewebe und möglichst viel Dermis wurden mit dem Skalpell entfernt, bis nur eine dünne Hautschicht übrig blieb. Diese wurde dann in eine neue Petrischale überführt und in dünne Streifen geschnitten. Dann wurden etwa 200 µl Trypsinlösung (Anhang 7.1) zwischen die Streifen pipettiert und die Petrischale für 90 bis 120 Minuten bei 37°C inkubiert. Sodann wurde die Epidermis mit zwei Pinzetten von der verbliebenen Dermis getrennt. Die Epidermis wurde in ein neues steriles 15 ml Falcon-Röhrchen (Greiner, Frickenhausen, D) überführt, sodann 2 ml Waschmedium (Anhang 7.1) und 200 µl DNase Lösung (Anhang 7.1) zugegeben und kurz auf einem Rüttler bewegt. Das Röhrchen wurde fünf Minuten bei 37°C inkubiert, dann nochmals eine Minute mäßig stark auf dem Rüttler bewegt. Im Anschluß wurde die Zellsuspension durch ein Nylonnetz mit 50 µm Maschenweite hindurch in ein neues steriles 15 ml Falcon-Röhrchen pipettiert. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer mittels Trypanblaufärbung bestimmt.

Diese Zubereitung und Anreicherung der epidermalen Zellen aus Leichenhaut folgte einem publizierten Protokoll [46], die im wesentlichen der soeben beschriebenen Methodik entspricht.

2.3 Immunphänotypisierung epidermaler Zellsuspensionen

Zur Färbung wurden je $2-5 \times 10^5$ Zellen der unangereicherten Zellsuspension aus entzündlicher Haut von Probanden auf alle FACS-Röhrchen (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) gleichmäßig verteilt, mit FACS-Puffer (Anhang 7.1) gewaschen und zur Färbung eingesetzt. Das Färbeprotokoll stellt eine indirekte Dreifarbenfluoreszenzfärbung vitaler epidermaler Langerhans Zellen dar. Alle Inkubationen erfolgten im Dunkeln bei 4°C. Zunächst erfolgte eine Inkubation mit dem Primärantikörper (Anhang 7.2) in einer Endkonzentration von 1µg/ml, anschließend wurde einmal in FACS-Puffer gewaschen. Es folgte eine Inkubation für 30 min. mit dem Sekundärantikörper (Jackson, West Grove, USA) in einer 1:200 Verdünnung, dann wurde einmal in FACS-Puffer gewaschen. Freie Bindungsstellen des Sekundärantikörpers wurden für 15 min. in normalem Mausserum (Sigma, Deisenhofen, D), Endverdünnung 1:10, geblockt, dann wurde einmal in FACS-Puffer gewaschen. Schließlich wurde das membranständige CD1a Molekül über eine 30 min. Inkubation in den mit Phycoerythrin (PE) markierten Antikörper T6RD1 (Coulter, Krefeld, D) gegengefärbt, gleichzeitig wurde eine Vitalfärbung mit dem DNA-Farbstoff 7-Amino-Actinomycin-D (7AAD) (Sigma) in einer Endkonzentration von 1 µg/ml durchgeführt. Als Kontrolle wurde im letzten Röhrchen der unspezifische Kontrollantikörper IgG1RD1 (Coulter) zugegeben. Nach einem letzten Waschvorgang in FACS-Puffer erfolgte die Einmessung der Zellen am Durchflußzytometer. Eine Zusammenstellung der eingesetzten Antikörper findet sich im Anhang (7.2).

2.4 Durchflußzytometrische Analyse der Zellsuspensionen

Durchflußzytometrische Untersuchungen ermöglichen bei geringem Materialverbrauch und Färbeaufwand die hochsensitive, quantitative Analyse membranständiger Oberflächenantigene und sind daher gut zur Untersuchung entzündlicher Haut geeignet. Durch entsprechende Permeabilisierungsschritte sind auch zytoplasmatische Antigene einer quantitativen Analyse zugänglich.

Die gefärbten Zellsuspensionen wurden mit einem FACScan Durchflußzytometer (Becton Dickinson, Mountain View, USA) analysiert. Die Zellsuspension wurde bis zum Einmessen bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt. Die gefärbten Zellen wurden unfixiert in einer Geschwindigkeit von 60µl/min. eingemessen.

Zur Auswertung wurde die Cell Quest Software benutzt. Die vitale Langerhans Zellpopulation wurde durch eine Kombination von Vorwärts-/Seitwärtslichtstreuung (FSC/SSC) und CD1aPE/7-Amino-Actinomycin-D (Fl2/Fl3) Parametern elektronisch auf die Analyse von vitalen, CD1a-positiven Einzelzellen eingegrenzt. Für die weitere Analyse wurde mit Hilfe der Software die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der eingegrenzten Zellpopulation ermittelt [54]. Um auch an verschiedenen Versuchstagen vergleichbare quantitative Resultate für einen Vergleich der Rezeptordichte zu erlangen, wurde eine Normalisierung der MFI-Werte der jeweils untersuchten Rezeptoren anhand der MFI-Werte des zugehörigen Kontrollantikörpers nach folgender Formel vorgenommen:

$$rFI = (MFI (Rezeptor) - MFI (Kontrolle)) / MFI (Kontrolle)$$

Der relative Fluoreszenzindex (rFI) ist durch die Normalisierung von kleineren tagesbedingten Schwankungen der Geräteeinstellung weitgehend unabhängig [54]. Im Gegensatz zu der älteren, bei geringeren Unterschieden zwischen den Fluoreszenzintensitäten häufig verwendeten Angabe in 'Prozent positiver Zellen' lassen sich mit Berechnung der rFI-Werte auch größere Unterschiede zwischen den Fluoreszenzintensitäten zuverlässig wiedergeben. Ein rFI-Wert von null entspricht in der grafischen Darstellung zwei übereinanderliegenden Histogrammkurven, ein rFI-Wert von zehn einer Verschiebung der Histogrammkurven um eine logarithmische Dekade.

Liegen in der zweidimensionalen graphischen Darstellung mehrere Subpopulationen vor, kann durch elektronisches Eingrenzen der Zellpopulationen, dem Setzen der 'gates', eine für jede Subpopulation getrennte Bestimmung der rFI-Werte durchgeführt werden.

2.5 Kultur dendritischer Zellen aus Monozyten des peripheren Blutes (MoDC)

Venenblut wurde in Kalium-EDTA-beschichteten Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht, D) abgenommen und mehrfach invertiert. In einem 50 ml Gewebekulturröhrchen (Greiner) wurden 9 Teile Venenblut mit einem Teil 6% Dextran-Lösung (Anhang 7.1) versetzt und für 20 - 40 min. bei Raumtemperatur (RT) stehengelassen, um das Absinken der Erythrozyten zu erreichen. Das monozytenreiche Plasma wurde vorsichtig mit einer sterilen Pipette abgenommen, und in Falcon-Röhrchen auf Nycoprep (Nycomed, Oslo, Norwegen) überschichtet.

Zum Erhalt monozytärer Zellen wurden die Röhrchen in einer ruckfreien Zentrifuge für 15 min. bei Raumtemperatur und 800 g (1750 rpm) zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde die Interphase und ein Teil des Nycoprep vorsichtig abpipettiert und Monozyten-Waschmedium (Anhang 7.1) hinzugegeben. Zur Abtrennung von Thrombozyten folgten drei weitere gleichartige Waschschrte mit Monozyten-Waschmedium.

Zur Kultur wurden 1 Mio. Zellen in 1 ml Monozyten-Kulturmedium (Anhang 7.1) resuspendiert, ein Teil der Zellen wurde zur sofortigen Immunphänotypisierung entnommen.

Sofort wurden je 1 ml Kulturmedium 500 U/ml GM-CSF (Leucomax, Sandoz, Basel, Schweiz) und 500 U/ml Interleukin-4 (human recombinant IL-4, Gibco, Paisley, Schottland) hinzugegeben und in eine 24-well Kulturplatte (Costar, Corning, USA) transferiert. Die Platten wurden für 6 Tage in einem Wassermantelinkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Am zweiten Tag wurde nochmals die halbe Zytokindosis (250 U/ml IL4 und 250U/ml GM-CSF) zu den Zellen hinzugegeben, am vierten Tag wurde ein vollständiger Mediumwechsel unter Einsatz der vollen Zytokindosis vorgenommen.

2.6 Anreicherung epidermaler Langerhans Zellen

Zur Anreicherung der Langerhans Zellen in Suspension wurden die aus Leichenhaut gewonnenen Zellen pelletiert und für 1 min. einer hypotonen Schockbehandlung mit 10 ml einer hypotonen gepufferten Kochsalzlösung (Anhang 7.1) unter gleichzeitigem kräftigem Schütteln ausgesetzt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 40 ml Kulturmedium vermischt und eine 15 minütige Dichtegradienten-Zentrifugation auf Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Norwegen) durchgeführt [46]. In Abhängigkeit des sehr unterschiedlichen biologischen Ausgangsmaterials enthielt die Interphase zwischen 20-70 % vitale Langerhans Zellen. Zur nachfolgenden durchflußzytometrischen Analyse wurden zwei Waschschrte in FACS-Puffer zwischengeschaltet.

2.7 Durchflußzytometrische DNA-Analyse

Zur Bestimmung des DNA-Gehalts und nachfolgenden Zellzyklusanalyse wurden verschiedene DNA-Farbstoffe wie Propidiumjodid (Sigma), SYTOX-Green (Molecular Probes, Eugene, USA) und 7-Amino-Actinomycin-D (Sigma) in Verbindung mit Zelllinien normaler und entzündlich veränderter Haut eingesetzt.

Zur Analyse gelangten die zellbiologisch charakterisierten Linien MOLT4 und U937 [23], epidermale Zellsuspensionen aus frisch präparierter Leichenhaut (2.2) beziehungsweise entzündlicher Haut. Je 2×10^5 bis 5×10^5 Zellen wurden in ein FACS-Röhrchen pipettiert. Die Zellsuspension wurde bei 750 g (1200 rpm) und Raumtemperatur in PBS gewaschen, in PBS resuspendiert und nochmals abzentrifugiert.

Zur Gegenfärbung vitaler epidermaler dendritischer Zellen wurden T6RD1 und 7AAD in einer Konzentration von jeweils 1 µg/ml hinzugegeben, dann für 30 min. bei 4°C inkubiert. Ein Waschschrift in FACS-Puffer folgte. Zur Kontrolle der CD1a-Färbung wurde ein identisches Röhrchen mit IgG1RD1 (1 µg/ml) und 7AAD (1 µg/ml) vorbereitet, die Positivkontrolle mit T6RD1 (1 µg/ml) versetzt, und nach gleichem Schema inkubiert.

Alle Röhrchen wurden nach 30 min. dreimalig mit 2 ml FACS-Puffer aufgefüllt, und dreimalig zentrifugiert. Nachdem beim letzten Schritt dekantiert wurde, wurden 100 µl Paraformaldehyd-Lösung (PFA) 4% (Anhang 7.1) zur Permeabilisierung der Zellen beim Rühren auf dem Rüttler hinzugefügt und 30 min. bei Raumtemperatur dunkel inkubiert. Der nächste Schritt beinhaltete die Zentrifugation der kurz zuvor mit 2 ml Saponin-Waschpuffer (Anhang 7.1) versetzten Suspensionen. Nach zweimaligem Waschen mit dem Detergens Saponin wurde eine 0,5 µM frisch angesetzte SYTOX-Lösung in einer Menge von 300 µl zur DNA-Färbung eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 40 min. bei 4°C wurden die Zellen zweimalig mit FACS-Puffer gewaschen und am Durchflußzytometer, wie unter 2.4 beschrieben, eingemessen.

2.8 Die gemischte Haut-Lymphozytenreaktion

Zur Untersuchung der Lymphozyten-stimulierenden Kapazität epidermaler dendritischer Zellen wurden gemischte Haut-Lymphozytenreaktionen (SMLR) durchgeführt. Antigen-präsentierende Zellen der Epidermis fungieren dabei als Stimulatoren der aus dem peripheren Venenblut isolierten Lymphozyten.

Zunächst wurden epidermale Zellsuspensionen in der unter 2.2 beschriebenen Technik zubereitet, zweimal in Waschmedium gewaschen und der Prozentsatz CD1a positiver Zellen durchflußzytometrisch bestimmt. Autologe T-Zellen wurden aus heparinisiertem Venenblut durch Dichtegradientenzentrifugation über einen Lymphoprep-Gradienten [7] gewonnen und zweimal mit Waschmedium gewaschen. Zum Entfernen spezifischer Subpopulationen aus den epidermalen Zellsuspensionen entzündlicher Haut wurde ein Inkubationsschritt mit Antikörper-konjugierten magnetischen Partikeln, sogenannten immunomagnetischen Beads (Dynabeads, Dynal, Hamburg, D), zwischengeschaltet. Die Beads wurden nach der Anleitung des Herstellers vor dem Aufbringen der jeweiligen Antikörper dreimalig mit Lymphozyten-Waschmedium (Anhang 7.2) gewaschen. Zum Entfernen von Langerhans Zellen und T-Lymphozyten wurde eine Mischung aus 50 µl Sheep-anti-mouse 280 µm beads mit 5 µl BL6-AK (Konzentration 200 µg/ml, Immunotech, Marseille, Frankreich) und 5 µl CD3-AK (Konzentration 200 µg/ml, Immunotech) benutzt. Zum Entfernen von inflammatorischen dendritischen epidermalen Zellen (IDEC) und T-Lymphozyten wurde mit einer Mischung aus CD11b-AK (Konzentration 200 µg/ml, Pharmingen, San Diego, USA) und CD3-AK erreicht. Zum Entfernen von T-Lymphozyten als dritter Ansatz wurden 5 µl CD3-AK benutzt. Die peripheren Lymphozyten wurden gleichfalls mittels immunomagnetischer Beads von kontaminierenden Zellen befreit, hierzu wurden Antikörper gegen HLA-DR (BL2-AK) (Konzentration 200 µg/ml, Immunotech), CD14 (Konzentration 200 µg/ml, Immunotech) und CD19 (Konzentration 200 µg/ml, Immunotech) eingesetzt.

Dann wurden 1×10^5 T-Zellen für 5 Tage mit der epidermalen Zellsuspension, die 2×10^3 CD1a-positive Zellen enthielt, in einem Gesamtvolumen von 200 µl in einer 96-well Rundbodenplatte (Costar, Corning, USA) in Kultur genommen. Alle Kulturbedingungen wurden mindestens dreifach angesetzt. Am fünften Kulturtag, 18 Stunden vor Kulturabbruch, wurde dem Kulturansatz ^3H -Thymidin (Amersham International, Amersham, England) in einer Aktivität von 1 µCi/ well hinzugefügt. Zum Kulturabbruch wurden die Kulturplatten auf -80°C schockgefroren. Die von den Zellen aufgenommene Aktivität wurde nach Zugabe von 2 ml Szintillationsflüssigkeit Scintillator 299 (Packard, Downers Grove, USA) in einem

Flüssigkeits-Szintillationszähler (MINAXI Tri-CARB 4000, Packard) ermittelt und als Zerfälle pro Minute (cpm) ausgegeben. Aus diesen Werten wurden Stimulationsindices (rSI) nach folgender Formel errechnet:

$$\text{RSI} = (\text{cpm}(\text{SMLR}) - \text{cpm}(\text{T-Zellen})) / \text{cpm}(\text{T-Zellen})$$

3 Ergebnisse

3.1 Immunphänotypisierungen monozytärer und Inflammatorischer Dendritischer Epidermaler Zellen

Zum phänotypischen Vergleich der aus Monozyten generierten dendritischen Zellen (MoDC) mit LC und IDEC wurden mehrere Versuchsreihen mit diesen Zellen durchgeführt. Die Blutproben zur Monozytenisolation stammten von hautgesunden Probanden oder von Patienten mit verschiedenen entzündlichen Hauterkrankungen. Zunächst wurde am Tag 0 eine durchflußzytometrische Untersuchung der auf ihre CD14-Expression hin gegateten Monozyten mit unterschiedlichen Oberflächenmarkern (siehe unten) durchgeführt. Nach 4 und 6 Tagen Kulturnahme in verschiedenen Kulturansätzen (2.5) wurde eine weitere Immunphänotypisierung der dann CD1a-positiven, unreifen MoDC durchgeführt, um eine vergleichende Charakterisierung der unreifen MoDC mit ihren Ursprungszellen und dem Phänotyp frisch isolierter IDEC zu erreichen.

3.1.1 Der Immunphänotyp unreifer MoDC entspricht weitgehend dem Immunphänotyp der IDEC, nicht jedoch dem der LC

Der Immunphänotyp der IDEC, sowie unreifer MoDC wurde bezüglich mehrerer für die Differenzierung dendritischer Zellen wesentlicher Oberflächenmarker durchflußzytometrisch untersucht. Der hochaffine IgE-Rezeptor auf unreifen MoDC weniger stark exprimiert wurde als auf der Oberfläche epidermaler dendritischer Zellen aus entzündlicher Haut, insbesondere beim atopischen Ekzem. Die Integrinketten CD11a wurden sowohl auf IDEC als auch auf MoDC gleichermaßen schwach exprimiert, wohingegen eine für beide Zelltypen gleich starke Expression für CD11b und CD11c nachweisbar war. Da auch LC eine, allerdings deutlich geringere CD11c-Expression aufwiesen, erwies sich CD11b als der geeigneteste Marker zur Differenzierung von LC und IDEC. Die kostimulatorischen Moleküle CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) waren auf den unreifen MoDC konstant stärker exprimiert als auf frisch aus der entzündlichen Haut isolierten LC oder IDEC. Das als 'skin-homing molecule' beschriebene CLA konnte sowohl auf LC und IDEC als auch auf den unreifen MoDC nachgewiesen werden. Frische Monozyten hingegen waren stets CLA negativ. Das für die Einwanderung in die Epidermis funktionell wesentliche E-Cadherin war sowohl auf LC und IDEC, nicht jedoch auf MoDC nachweisbar. Der Mannoserezeptor, welcher als Differenzierungsantigen unreifer MoDC beschrieben wurde, jedoch nicht auf frisch isolierten Monozyten und auf reifen MoDC vorkommt, wurde erwartungsgemäß auf den unreifen MoDC nachgewiesen. Während auch IDEC den Mannoserezeptor exprimierten, war dieses Molekül auf LC nicht nachweisbar.

IDEC und MoDC zeigten eine mittelgradig hohe CD1b-Expression, wohingegen LC stets CD1b-negativ waren. Der Thrombospondin-Rezeptor CD36 war sowohl auf IDEC als auch auf MoDC stets stark exprimiert. Langerhans Zellen hingegen tragen innerhalb der normalen Haut kein CD36 auf der Zelloberfläche. In chronisch-entzündlich veränderter Haut ist auf LC allerdings eine geringe CD36-Expression nachweisbar. Die Tabelle gibt eine vergleichende Übersicht des Immunphänotyps der verschiedenen Zelltypen:

Tabelle 1: Expression verschiedener Oberflächenmoleküle auf LC, IDEC, unreifen MoDC und frisch isolierten Monozyten. Die frisch isolierten Monozyten sind auf ihre CD14-Oberflächenfärbung hin elektronisch ausgewählt worden, LC, IDEC und MoDC, wurden über ihre CD1a-Expression selektiert. Einige dieser Oberflächenmarker sind diagnoseabhängig starken regulativen Einflüssen unterworfen. * nicht durchgeführt

	LC	IDEC	MoDC	Monozyten
CD1a	+++	+ / +++	+ / +++	∅
CD1b	∅	+ / +++	+ / +++	+
CD11a	∅	+	∅ / +	+++ / ++++
CD11b	∅ / ±	+++	+++	++
CD11c	+	+++	+++	++
E-Cadherin	+ / +++	+	∅	∅
FcεRI	∅ / ++	+ / ++++	+ / +++	∅ / +
FcεRII	∅ / ±	∅ / +	∅ / +	∅ / +
FcγRI/CD64	∅ / +	++	++	++
FcγRII/CD32	++	+++ / ++++	+++ / ++++	+ / +++
CD36	∅ / ++	+++ / ++++	+++ / ++++	+++ / ++++
CLA	+++	+++	++	∅
B7.1 (CD80)	∅ / +	+ / +++	+ / +++	∅
B7.2 (CD86)	∅ / +	∅ / +	+ / +++	+
CD115	*	*	∅	∅
CD83	∅	∅	∅ / +	∅
Mannose-Rezeptor	∅ / +	∅ / +	+++ / ++++	∅

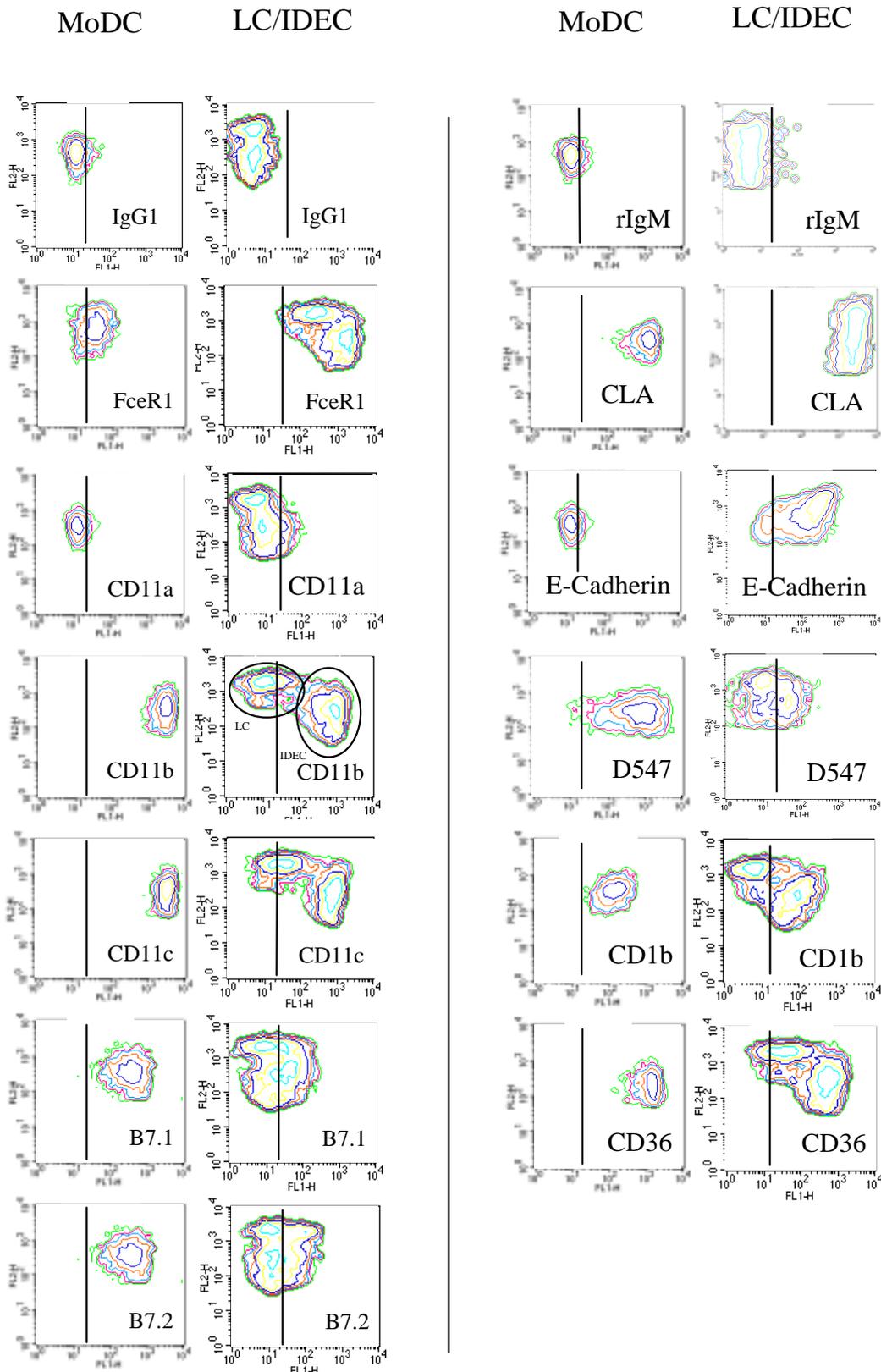


Abb. 2: Immunphänotyp unreifer MoDC nach 6-tägiger Inkubation mit IL4 und GM-CSF im direkten Vergleich mit dem Immunphänotyp der entzündlichen Hautproben (LC/IDEC)

Die linke Spalte zeigt den Immunphänotyp der unreifen MoDC, die rechte Spalte den Immunphänotyp der LC/IDEC. Der Immunphänotyp unreifer MoDC entspricht weitgehend dem der IDEC. Die einzige Ausnahme stellt das auf LC stark exprimierte Adhäsionsmolekül E-Cadherin dar, welches auf MoDC negativ bleibt.

3.1.2 Der Immunphänotyp der IDEC ist teils diagnoseabhängig moduliert, teils diagnoseunabhängig konstant

Im Rahmen der immunphänotypischen Untersuchungen zeigte sich, daß einzelne Oberflächenmoleküle der IDEC in Abhängigkeit von der Diagnose eine starke Schwankungsbreite der Expression aufwiesen. Dies war zum Beispiel bei FcεRI, CD32 oder CD64 der Fall. Da die diagnoseabhängige Regulation einzelner Oberflächenstrukturen jedoch bereits untersucht ist [54], soll an dieser Stelle nicht näher darauf eingegangen werden.

3.1.3 Eine 6-tägige Kulturdauer mit Interleukin-4 und GM-CSF ergibt eine stärkere CD1a-Expression von MoDC als eine 4-tägige Kulturdauer

Zum Vergleich der CD1a-Expression kultivierter Monozyten wurde eine Immunphänotypisierung der Zellsuspension durchgeführt. Diese ergab bei 1×10^6 für 6 Tage eingesetzten Zellen eine stärkere CD1a-Expression als für die nur 4 Tage in Kultur genommenen Monozyten. Eine wesentliche Steigerung der CD1a-Expression durch noch längere Kulturnahme als sechs Tage war nicht zu erreichen.

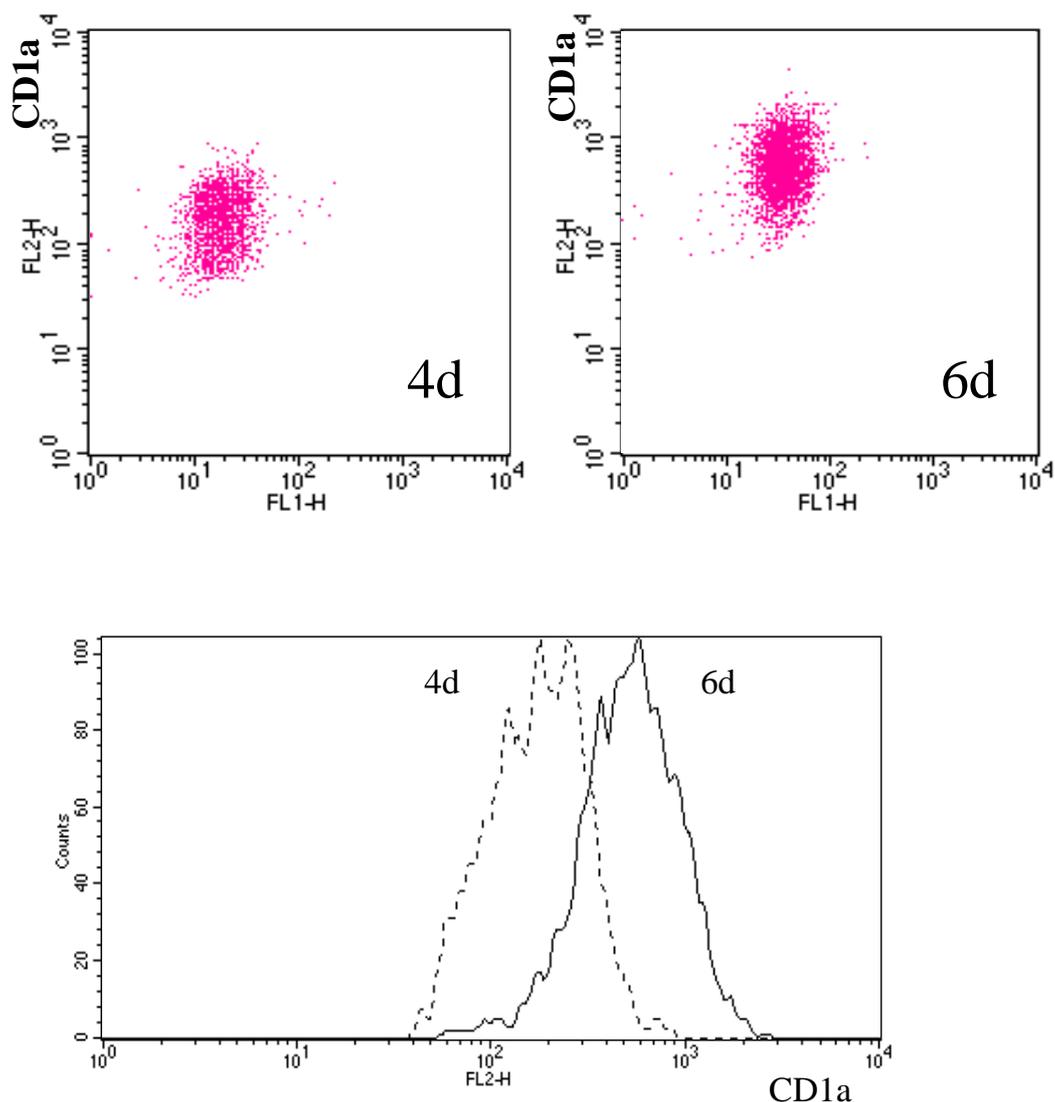


Abb. 3 und 4: CD1a-Expression unreifer MoDC nach 4 und 6 Tagen in Kultur
Qualitative Analyse der CD1a-Expression auf unreifen MoDC nach 4 und 6 Tagen in Kultur mit Interleukin-4 und GM-CSF. Deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität der CD1a positiven Zellen während der Inkubation für zwei weitere Tage.

3.1.4 Interleukin-13 und GM-CSF bewirken eine Ausreifung von Monozyten zu MoDC

Die Ausreifung frisch isolierter Monozyten zu MoDC mit Interleukin-4 (IL-4) und GM-CSF ist eine seit mehreren Jahren etablierte Methode zur Gewinnung interstitieller dendritischer Zellen [35]. Für das kutane Mikromilieu chronisch-entzündlicher Hauterkrankungen ist jedoch das dem IL-4 strukturell verwandte Interleukin-13 (IL-13) möglicherweise relevanter, da dieses die Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine reduziert, eine Monozytendifferenzierung induziert, und möglicherweise von Zellen in der entzündlichen Epidermis gebildet wird. Deswegen wurde in einigen Versuchen Interleukin-4, das von T-Lymphozyten gebildet wird und über den hochaffinen IgE-Rezeptor die IgE-Synthese stimuliert, durch Interleukin-13 ersetzt. Die durchflußzytometrische Analyse zeigte ein durchweg identisches Phänotypisierungsmuster der unter 3.1.1 untersuchten Oberflächenmoleküle für die in IL-4 plus GM-CSF oder in IL-13 plus GM-CSF generierten MoDC bei identischer Kinetik der CD1a-Expression.

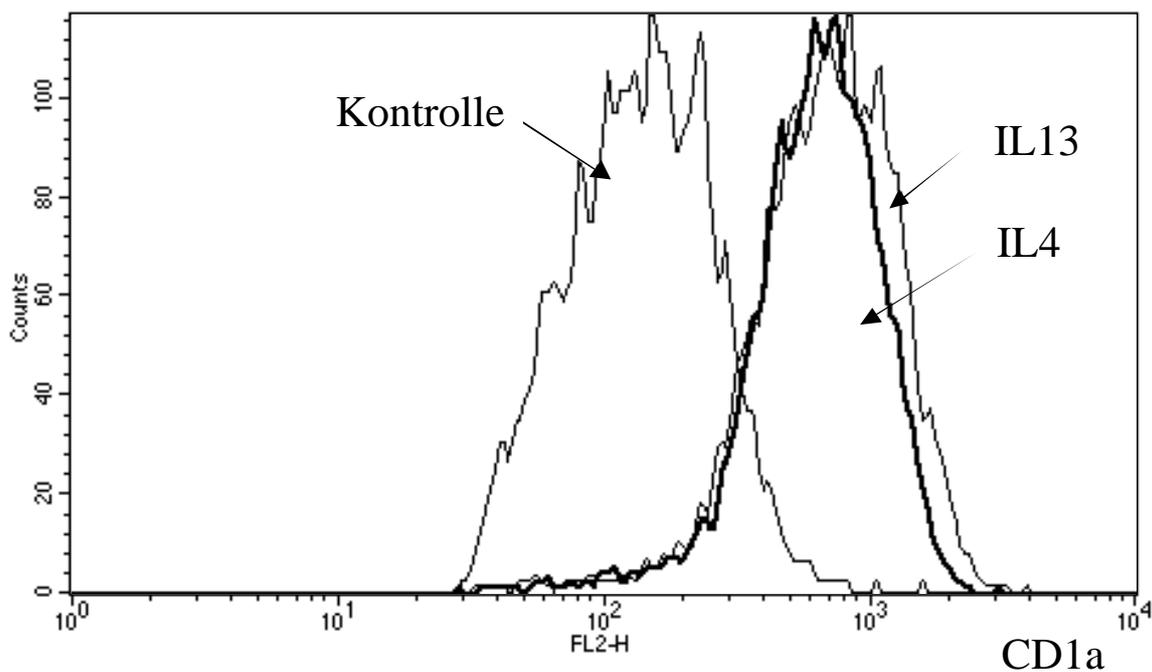


Abb.5: Vergleich der Ausreifung von MoDC mit IL-4 und IL-13 anhand des Phänotyps Fluoreszenzintensität bei 6-tägiger Kulturnahme in GM-CSF und IL13-haltigen Medium im Vergleich zu GM-CSF und IL4-haltigen Medium. Es tritt keine verstärkte CD1a Expression bei unterschiedlichen Kulturbedingungen auf.

3.1.5 Zugabe von autologem Serum in die Kultur mit Interleukin-4 und GM-CSF hemmt die Ausreifung von Monozyten zu MoDC

In verschiedenen Kulturansätzen wurde bei einem Teil der Zellen dem IL-4 und GM-CSF enthaltenden Kulturmedium 10% Humanserum des jeweiligen Monozytenspenders zugesetzt. Die durchflußzytometrische Analyse zeigte, daß in Kulturen nach 6 Tagen Kultur mit autologem Serum nur ein geringer Prozentsatz der eingesetzten Zellen ($9,15 \pm 3,31\%$) CD1a-positiv wurden, während die Ausbeute in Abwesenheit des Humanserums bei $70,35 \pm 11,8\%$ lag. Zusätzlich fiel auf, daß die CD1a-Expression in Anwesenheit von Humanserum deutlich schwächer war, als in Abwesenheit von autologem Serum.

In diesen Versuchen zeigte sich auch eine geringere CD1a-Expression bei den mit Humanserum inkubierten Monozyten (Abb.6).

Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, daß ein Zusatz von Humanserum die Ausreifung peripherer Blutmonozyten zu dendritischen Zellen hemmt.

n=3	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	MW	St.Abw.	St.Fehler
Ohne HS (%)	48,37	88,79	73,9	70,35	20,44	11,8
Mit HS (%)	13,15	11,73	2,58	9,15	5,74	3,31

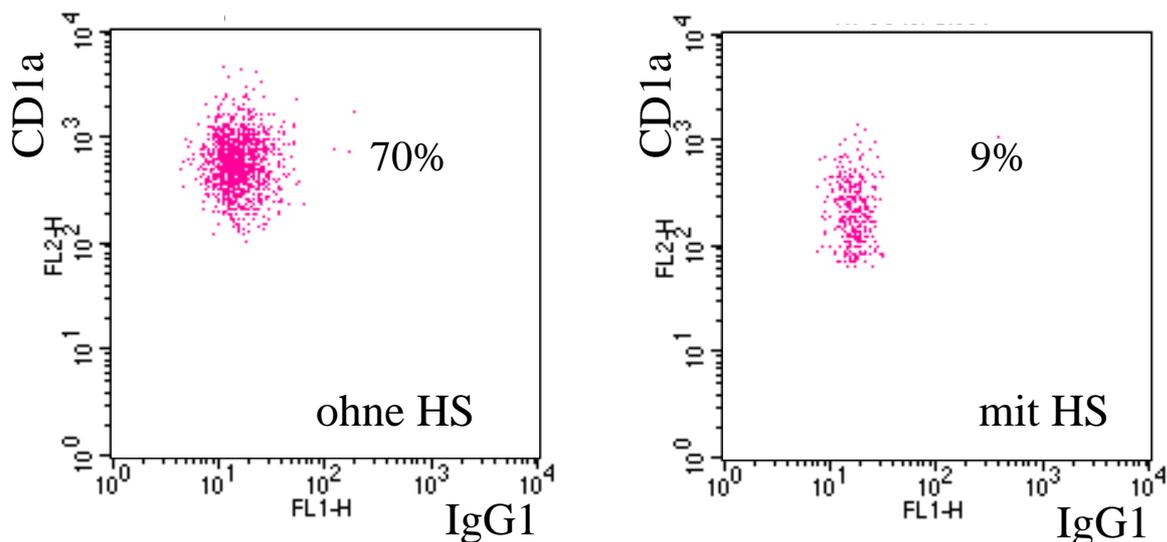


Abb.6: Inkubation mit autologem Serum hemmt die Genese von MoDC

Die Expression des DC-Markers CD1a nach 6-tägiger Kultur mit und ohne Zugabe von 10% Humanserum (HS) zeigt, daß nur ein Bruchteil der eingesetzten Monozyten zu MoDCs ausdifferenziert. Diese MoDC weisen eine geringere CD1a-Expression auf.

3.2 Zellzyklusuntersuchungen

3.2.1 Etablierung einer durchflußzytometrischen Methode zur Untersuchung des Zellzyklus epidermaler Zellsuspensionen

3.2.1.1 Die gemischt logarithmisch/lineare Datenerfassung zur DNA-Analyse gemischter Zellpopulationen

Die im Durchflußzytometer erfaßten Fluoreszenzsignale sind in einer logarithmischen oder einer linearen Darstellung möglich. Eine Kombination aus linearer Datenaufnahme der DNA-Färbung (SYTOX Green) und logarithmischer Aufnahme des Immunphänotyps (CD1a-PE-konjugierter Antikörper) erwies sich unter den vorgegebenen Bedingungen als sinnvollste Lösung. Dabei erfordert die Analyse des Zellzyklus mit DNA-Farbstoffen eine lineare Darstellung der Fluoreszenzintensität, um die Zellen den einzelnen Zellzyklusstadien korrekt zuordnen zu können. Die Oberflächenfärbung, beispielsweise von Langerhans Zellen zur Identifikation der LC in gemischten Zellsuspensionen, erfordert jedoch eine logarithmische Darstellung der Fluoreszenzintensität, da hier biologisch sehr hohe Schwankungen der Fluoreszenzintensität vorliegen.

3.2.1.2 Sheath-fluid verändert die Fluoreszenzintensität

Bei der Einmessung zeigte sich bereits bei den ersten Versuchen die Schwierigkeit, daß bei wiederholter Einmessung des identischen Röhrchens ein langsamer Abfall der SYTOX-Fluoreszenzintensität auftrat. Dieser Rückgang der Fluoreszenzintensität war augenscheinlich vom Volumen der hinzugelagerten Trägerflüssigkeit (FACS-Flow; Becton Dickinson) und der Zeitdauer, die diese Flüssigkeitsmenge auf die gefärbte Zellsuspension einwirken konnte, abhängig.

Da die FACS-Flow Trägerflüssigkeit zur Vermeidung von Verkalkungen innerhalb des Leitungssystems des Geräts mit EDTA versetzt ist und bekannt war, daß mehrere Fluoreszenzfarbstoffe ihre Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Kalziumkonzentration ändern, wurde die Rolle des EDTA auf die SYTOX-Fluoreszenzintensität in einem weiteren Versuchsansatz näher untersucht.

Hierbei wurden 5 min. vor dem Einmessen den fertig gefärbten FACS-Röhrchen jeweils 50, 100, 200 und 300 µl einer 10mM EDTA-Lösung, die gleichen Mengen der FACS-Flow Lösung (Becton Dickinson) und PBS als Negativkontrolle zugegeben. Die Fluoreszenzintensität der mit PBS versetzten Probe blieb zeitkinetisch konstant, während beide EDTA-

haltigen Lösungen einen Rückgang der Fluoreszenzintensität bewirkten. In den folgenden Versuchen wurde daher als Trägerflüssigkeit im Durchflußzytometer nur noch PBS verwendet.

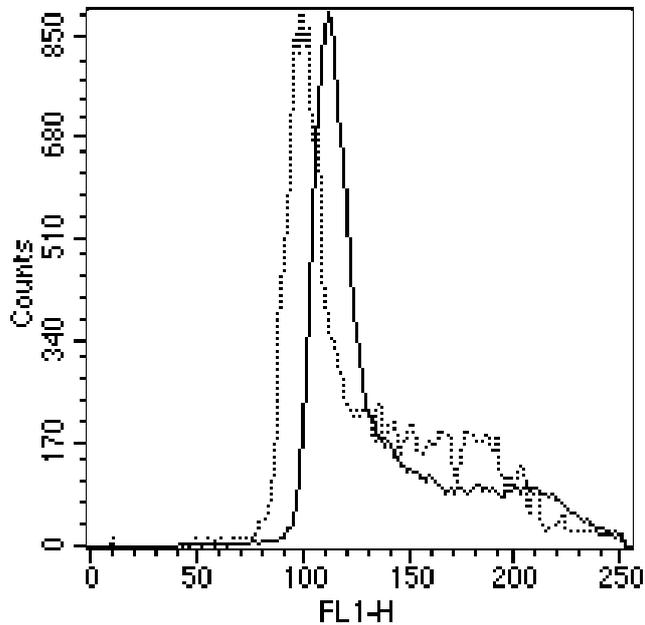


Abb.8: Fluoreszenzintensitätsverlust durch Zugabe von EDTA-haltiger FACS-Flow-Hüllflüssigkeit

Fluoreszenzintensitätsverlust nach 5 min. Inkubation mit und ohne Zugabe von 100 µl EDTA-haltiger Trägerflüssigkeit (FACS-Flow) in ein Probenröhrchen mit 100 µl einer mit SYTOX gefärbten Zellsuspension. Die rechte Kurve zeigt die native Probe, die linke zeigt die Probe nach Zugabe von FACS-Flow-Flüssigkeit.

3.2.1.3 Fluoreszenzintensität ist abhängig von der Lagerung der SYTOX-Lösung

Um eine größtmögliche Standardisierung der Methode zu erreichen, wurde auch der Einfluß der Lagerungsdauer der vorbereiteten Färbelösung auf die Fluoreszenzintensität untersucht. Vorversuche wurden durchgeführt, die den Aktivitätsverlust der SYTOX-Arbeitslösung in einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ im Verlauf einer Lagerdauer von 2 Wochen abschätzten. Hierzu wurden verschieden alte Arbeitslösungen, die auf 4°C im Dunklen gelagert waren, in einem Parallelversuch getestet. Ausgehend von einer 'maximalen' Intensität der aus der $50\mu\text{M}$ Stammlösung frisch hergestellten $1\mu\text{M}$ Arbeitslösung wurde der Rückgang der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Lagerdauer bestimmt. Es zeigte sich bereits mit der 8 Tage auf 4°C gelagerten Lösung ein Rückgang in der Fluoreszenzintensität in der durchfluß-zytometrischen Analyse.

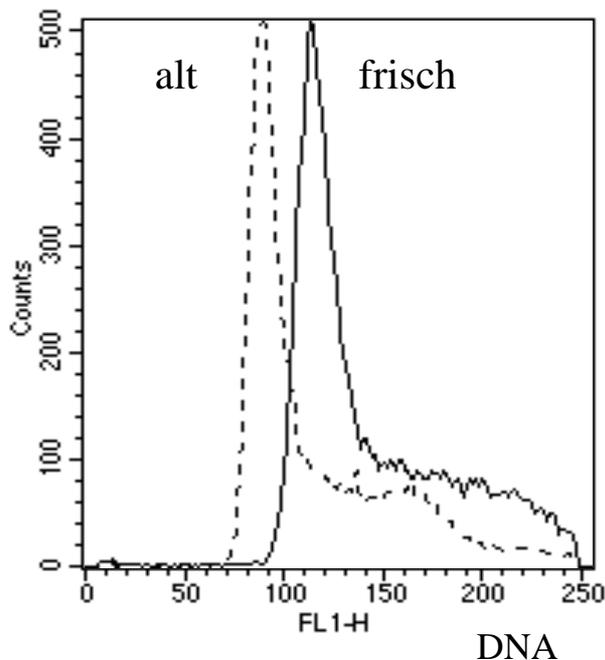


Abb. 9: Fluoreszenzintensitätsrückgang bei Verwendung älterer SYTOX-Lösungen
DNA-Histogramm einer U937 Zelllinie, die mit einer frischen und einer 8 Tage auf 4°C gelagerten $1\mu\text{M}$ SYTOX-Arbeitslösung angefärbt wurden. Der Fluoreszenzintensitätsverlust bei Verwendung der älteren Lösung ist deutlich sichtbar.

3.2.1.4 Fluoreszenzintensität SYTOX-Green gefärbter Zellsuspensionen ist abhängig von der eingesetzten Zellzahl im Volumen

In Vorversuchen wurde überprüft, ob die Fluoreszenzintensität der SYTOX-Lösung von der im Probenröhrchen eingesetzten Zellzahl abhängig ist, um auch bei unterschiedlich eingesetzten Zellzahlen eine einheitliche Fluoreszenzintensität zu erreichen. Hierzu wurden jeweils 2×10^5 bis 1×10^6 Zellen unter sonst gleichen Bedingungen einer Färbung unterzogen. Es zeigte sich, daß die Fluoreszenzintensität bei größeren Zellmengen zurückging, was sich in einer Linksverschiebung der Kurve zeigte. Um reproduzierbar gleichmäßige Fluoreszenzintensitäten zu erhalten, mußte die Zellzahl pro Röhrchen deshalb konstant gehalten werden.

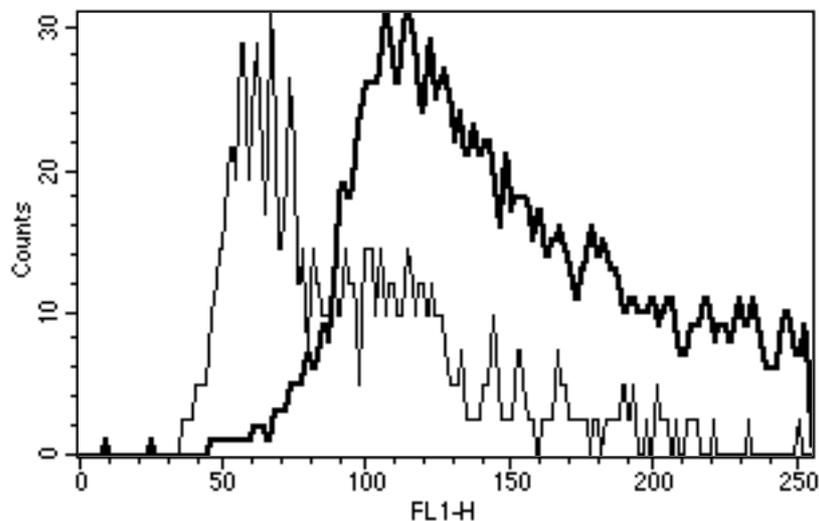


Abb.10: Höhere Zellzahlen bewirken eine geringere Fluoreszenzintensität bei gleicher SYTOX-Konzentration

Die linke Kurve zeigt bei einer höheren Zellzahl von 5×10^5 Zellen eine niedrigere Fluoreszenzintensität, die rechte Kurve eine höhere Intensität der Fluoreszenz bei einer Zellzahl von 2×10^5 .

3.2.1.5 Vitalfärbung mit 7AAD kann tote Zellen von der Zellzyklusanalyse ausschließen

Sowohl frisch isolierte epidermale Zellsuspensionen als auch Langzeitkulturen von Zelllinien enthielten neben vitalen Zellen auch einen gewissen Prozentsatz toter Zellen. Diese Zellen könnten das Ergebnis einer DNA-Analyse verzerren. Deshalb ist für die DNA-Analyse ein Verfahren notwendig, das tote Zellen von der Analyse ausschließt. Da der grüne Fluoreszenzkanal FL1 für die Bestimmung der DNA-Menge mit dem grün fluoreszierenden DNA-Farbstoff SYTOX vergeben war, wurde vor der Fixierung der Zellen zur DNA-Färbung bereits eine vorangehende Vitalfärbung mit dem dunkelrot fluoreszierenden DNA-Farbstoff 7AAD durchgeführt. Im Anschluß wurde dann die eigentliche Zellzyklusanalyse durchgeführt.

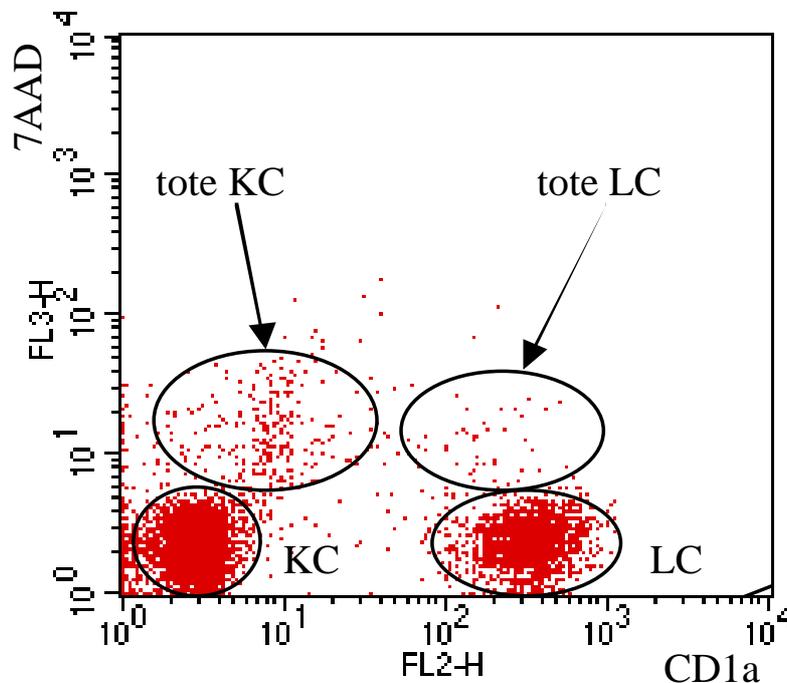


Abb.11: Vitalfärbung von Keratinozyten (KC) und Langerhans Zellen (LC)

Um eine Lebend/Tot-Differenzierung zu erhalten, wurden die Zellsuspensionen vor der Fixierung mit dem DNA-Farbstoff 7-Amino-Actinomycin-D (7AAD) gefärbt. Die toten LC und KC stellen sich als 7AAD positive Zellen dar; die lebenden KC und LC sind negativ im Fluoreszenzkanal 3 (FL3).

3.2.1.6 Fixierung mit Paraformaldehyd ist Ethanol überlegen

Um eine möglichst geringe Varianz der DNA-Färberesultate bei der quantitativen durchflußzytometrischen Analyse zu erzielen, ist eine Fixierung der Zellen vor Analyse des Zellzyklus sinnvoll. Deshalb wurden verschiedene Fixierungsmethoden in Vorversuchen verglichen. Die Zellen wurden deshalb zunächst mit dem Vitalfarbstoff 7AAD gefärbt, mehrfach gewaschen und dann zum Vergleich mit verschiedenen Fixierungslösungen inkubiert. Es standen Paraformaldehyd (4%) und Ethanol (96%) zur Verfügung. Als Detergens zur zusätzlichen Permeabilisierung der Membranen wurde ein Saponin-haltiger Waschpuffer (7.1) eingesetzt. Die nur mit Paraformaldehyd fixierten Zellen zeigten eine geringere Färbeintensität als die mit Paraformaldehyd fixierten und mit Saponin permeabilisierten Zellen. Die mit Ethanol fixierten Zellen zeigten einen starken Anstieg der Granularität im Seitwärtsstreulicht (SSC), was die Zellektion über die physikalischen Parameter FSC und SSC beeinträchtigte. Aus diesen Beobachtungen wurde gefolgert, daß eine sinnvolle Kombination von Fixierung und Färbung durch eine DNA-Färbung mit 7AAD, eine Fixierung mit Paraformaldehyd, danach eine Permeabilisierung der Membran mittels Saponin, und eine weitere DNA-Färbung mit SYTOX erreicht wurde.

3.2.2 Das U937/MOLT4 Zellgemisch ist ein geeignetes Modell für dendritische Zellen in epidermalen Zellsuspensionen

Eine Mischung der CD1a exprimierenden MOLT4 Zellen und der CD1a negativen U937 Zellen wurde als Modell für die normale und entzündliche Haut untersucht. Hierbei sollten die CD1a-negativen U937 Zellen als Modell für Keratinozyten, die CD1a-positiven MOLT4 Zellen als Modell für die Langerhans Zellen dienen. Unter der Verwendung dieser Zelllinien konnte ein reproduzierbares Modell für Zellzyklusmessungen epidermaler Zellsuspensionen entwickelt werden. Insbesondere war es von Vorteil, daß der Anteil der CD1a-positiven Zellen frei wählbar war, und so eine optimale Geräteeinstellung und Ausbeuteanalyse titrierbar wurde.

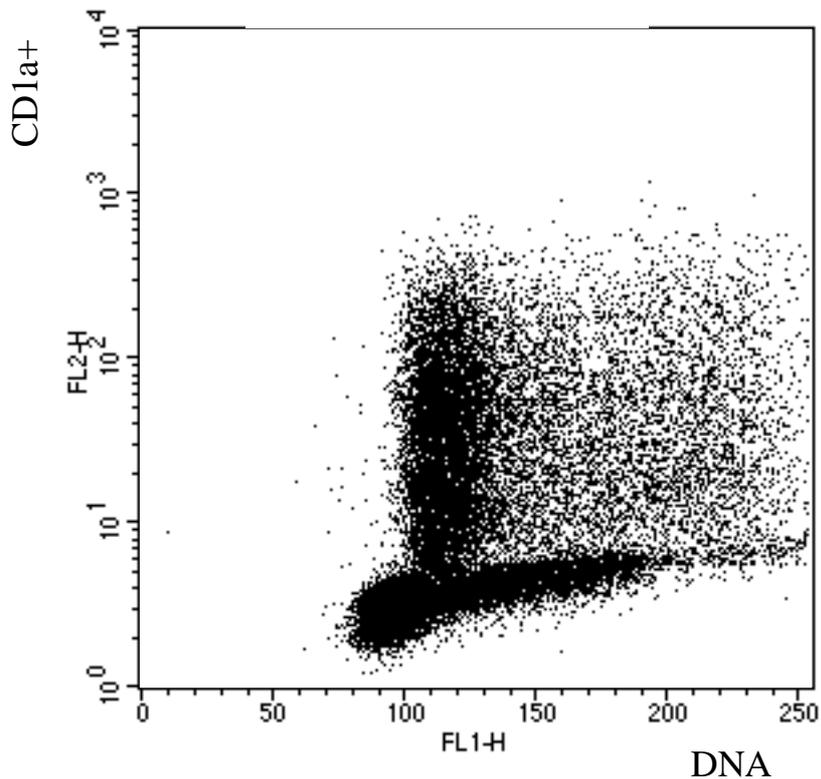


Abb. 12: MOLT4 und U937-Zellgemisch als Modell für entzündliche Haut

Dot-Plot-Darstellung einer gemischten MOLT4/U937 Zellsuspension in der SYTOX/CD1a Färbung. Die CD1a-positiven MOLT4 Zellen (entsprechen den CD1a-positiven dendritischen Zellen) lassen sich klar von den CD1a-negativen U937-Zellen (entsprechen den CD1a-negativen Keratinozyten) abgrenzen, was eine getrennte Analyse des Zellzyklus für jeden der beiden Zelltypen ermöglicht. Die CD1a-positiven MOLT4-Zellen enthalten mehr DNA als die CD1a-negativen U937-Zellen.

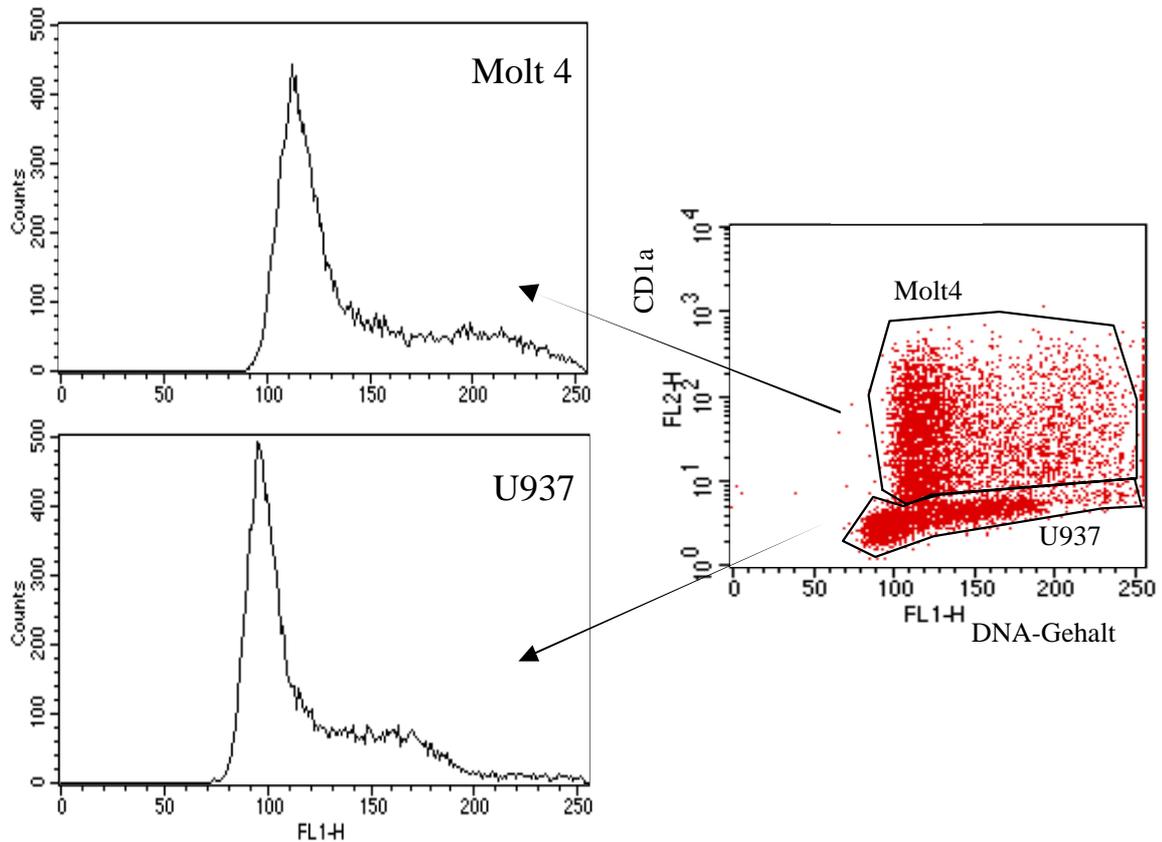


Abb.13: Zellinienspezifische Zellzyklusanalyse im MOLT4/U937 Modell

Die CD1a negative U937 Zellpopulation und die CD1a positive MOLT4 Zellpopulation wurden elektronisch selektiert und die SYTOX-Fluoreszenzintensität in linearer Auftragung dargestellt. Die DNA-Histogrammkurve (links) läßt sich für beide Zelllinien nach der CD1a-Expression getrennt darstellen. Die verwendeten 'gate settings' sind dargestellt.

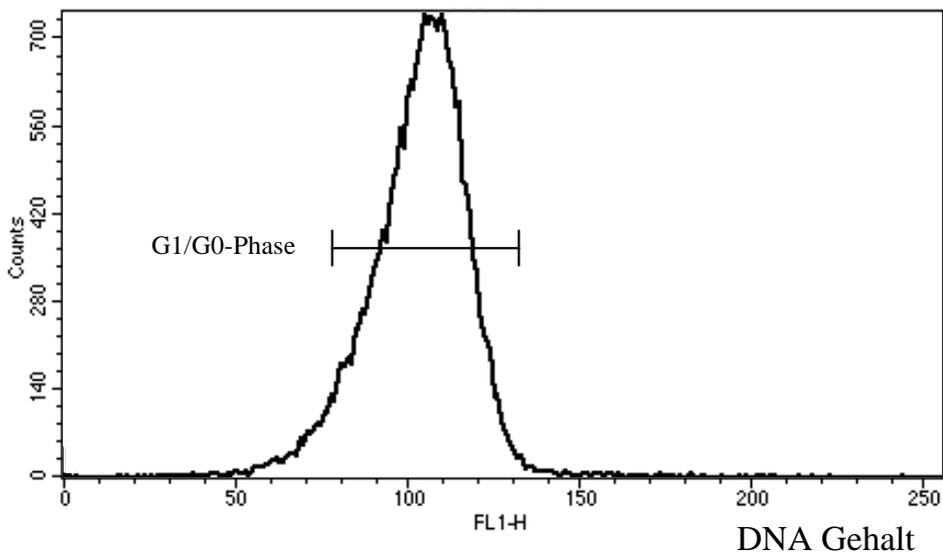


Abb.14: DNA-Gehalt ruhender Lymphozyten

Zellzyklusanalyse ruhender Lymphozyten. Sämtliche Zellen befinden sich in der G1/G0-Phase.

3.2.3 Wenige Keratinozyten treten in normaler Haut in den Zellzyklus ein

Die Untersuchung normaler, nicht entzündlicher Haut ist technisch einfacher als die Untersuchung entzündlicher Haut. Als erster Schritt wurde daher die am U937/MOLT4-Modell etablierte DNA-Färbung auf die normale Haut übertragen. Hierzu wurde normale Leichenhaut wie unter 2.2 bis 2.4. und 2.6 beschrieben angereichert und gefärbt. Die Messungen ergaben für die Keratinozyten reproduzierbar einen Zellzyklus mit abgrenzbarer G0/G1- und G2/M-Phase. Die S-Phase war nur bedingt abgrenzbar und ist daher in die G2-M-Phase mit eingeflossen. Es zeigte sich ein Anteil von 94,75% \pm 2,34 in der G0/G1-Phase und 5,25% \pm 2,34 in der S/G2-M-Phase.

n=3	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	MW
ruhend (%)	96,66	97,5	90,1	94,75
teilend (%)	3,33	2,5	9,9	5,25

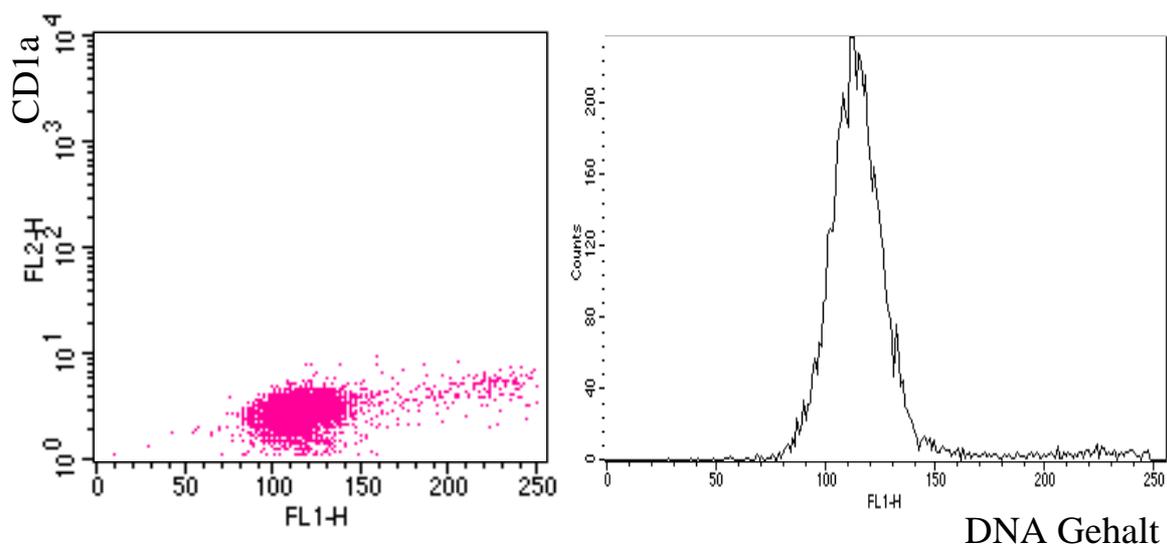


Abb.15: Zellzyklus von Keratinozyten in normaler Haut

Zellzyklus von Keratinozyten in normaler Haut. Der DNA-Gehalt von Keratinozyten in normaler Haut stellt sich als Fluoreszenz 1 in der x-Achse dar. Nur wenige Zellen befinden sich in der Mitose. Der größte Teil (96,66%) ist ruhend (G1/G0-Phase), ein kleiner Teil von 3,33% teilt sich.

3.2.4 Wenige Langerhans Zellen treten in normaler Haut in den Zellzyklus ein

In normaler, nicht entzündlicher Haut ist der Zellzyklus der epidermalen Langerhans Zellen bereits von Czernielewski und Mitarbeitern untersucht worden [13]. Sie fanden einen Anteil von 1,3-3,3% sich teilender LC in der S-Phase in angereicherten LC-Suspensionen. In der vorliegenden Arbeit fanden sich Werte von $7,7 \% \pm 0,85$ sich teilender LC in der S- und G2M-Phase. Die angereicherten Langerhans Zellen waren über ihre CD1a-Expression im Kanal FL2 gut von den Keratinozyten abzugrenzen.

n=3	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	MW
ruhend (%)	93,4	92,8	90,6	92,3
teilend (%)	6,6	7,2	9,4	7,7

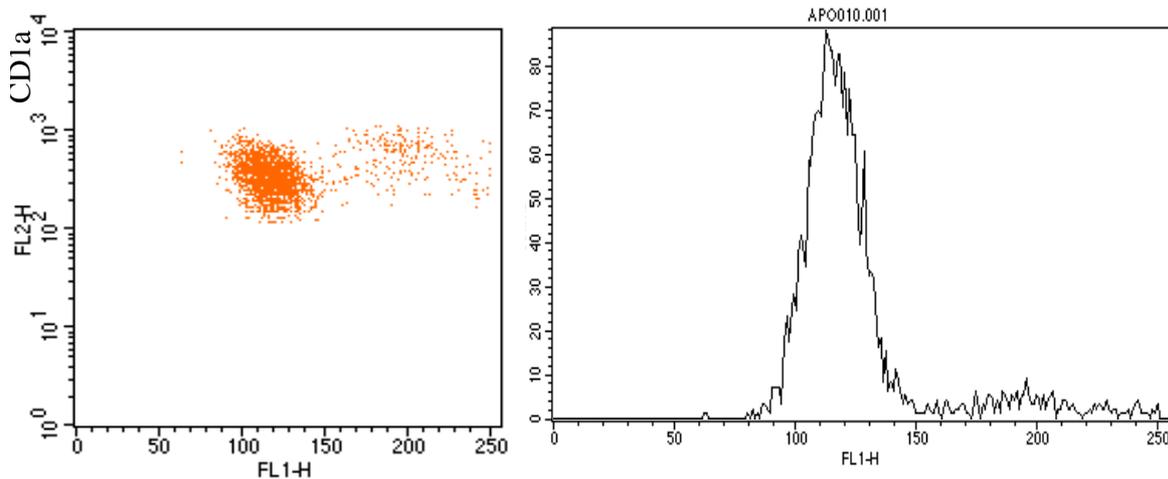


Abb.16: Zellzyklus von Langerhans Zellen in normaler Haut

Zellzyklus von Langerhans Zellen in normaler Haut.. Der DNA-Gehalt von LC in normaler Haut stellt sich als Fluoreszenz 1 in der x-Achse dar. Der größte Teil befindet sich in der ruhenden G1/G0-Phase (93,4%), 6,6% teilen sich.

3.2.5 Die Zellteilungsrate der Keratinozyten ist in entzündlicher Haut erhöht

Bei den meisten chronisch-entzündlichen Hauterkrankungen ist die Proliferationsrate für Keratinozyten erhöht. Zunächst konnte gezeigt werden, daß die CD1a-negativen Keratinozyten der entzündlichen Haut eine höhere spontane Teilungsrate in situ aufweisen als in normaler Haut. Es ergab sich ein Wert von 9,9%.

Diese Ergebnisse zeigen eine höhere Teilungsrate als in normaler Haut, was den Erwartungen entspricht [2].

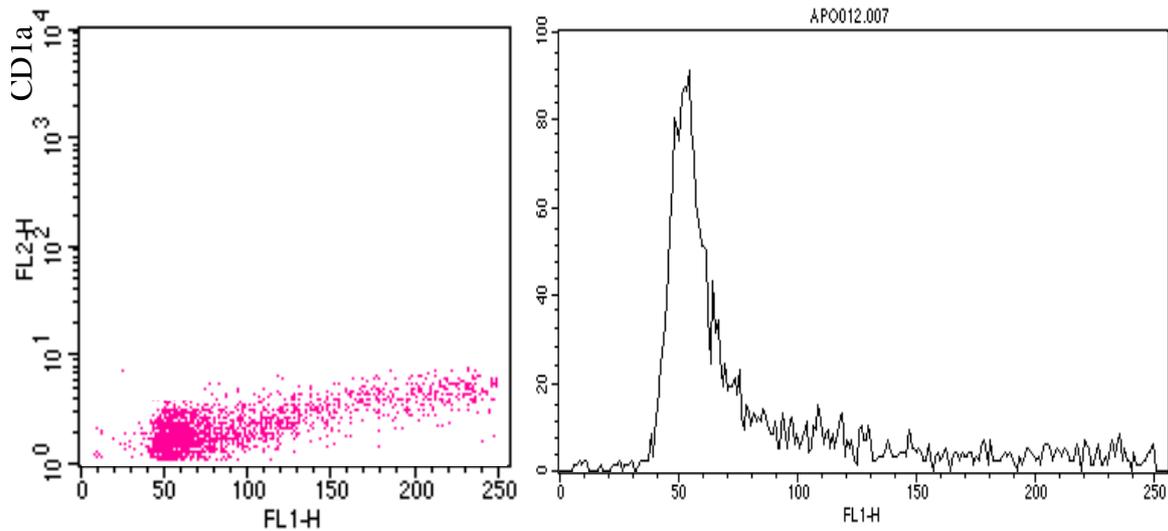


Abb.18: DNA-Analyse von Keratinozyten in entzündlicher Haut

Es zeigt sich ein Anteil von 90,1% ruhender Keratinozyten, korrespondierend zu einem Anteil von 9,9% sich teilender Zellen, der höher liegt als der Anteil sich teilender Keratinozyten in normaler Haut.

3.2.6 Langerhans Zellen und IDEC teilen sich in entzündlicher Haut

Auch bei entzündlicher Epidermis wurden Zellzyklusuntersuchungen für Langerhans Zellen und IDEC durchgeführt. Die Analyse dendritischer Zellen aus entzündlicher Haut gestaltete sich besonders schwierig, da das ohnehin sehr limitierte Zellmaterial zusätzlich einen nur geringen Anteil von etwa 2% CD1a-positiver Zellen aufwies. Im Vergleich zu den in entzündlicher Haut stark proliferierenden Keratinozyten war sowohl für Langerhans Zellen als auch für IDEC ein zahlenmäßig sehr geringer Anteil an Zellen im Bereich der S/G2M-Phase zu sehen. Aufgrund der geringen Zellzahl konnte von drei untersuchten Proben entzündlicher Haut nur ein Experiment quantitativ ausgewertet werden. Es fanden sich 11,7% in Teilung befindlicher CD1a positiver Zellen.

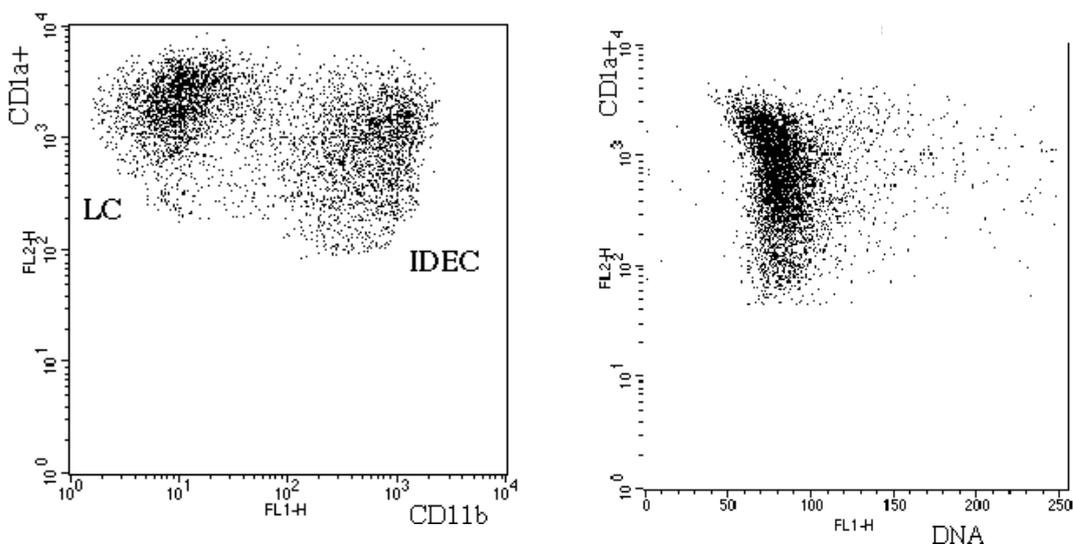


Abb.19: Zellzyklus CD1a-positiver Zellen in entzündlicher Haut

Es zeigt sich ein Anteil von 88,2% ruhender LC, 11,7% der LC teilen sich. Bei LC der normalen Haut betrug die Teilungsrate 7,7%. In der Doppelfärbung für CD1a und CD11b zeigt sich eine prozentuale Verteilung von 55,6% CD1a+/CD11b- LC und 44,4% CD1a+/CD11b+ IDEC innerhalb CD1a-positiven epidermalen dendritischen Zellen, was einem Prozentsatz von 1,74; % IDEC und 1,39 % LC entspricht.

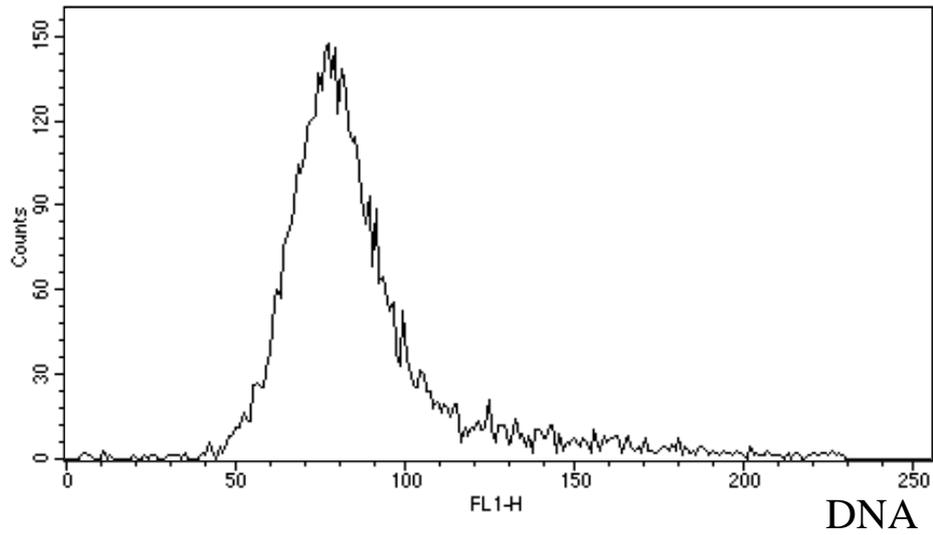


Abb. 20: Zellzyklus CD1a-positiver Zellen in entzündlicher Haut

Die DNA-Analyse zeigt einen geringen Prozentsatz proliferierender Zellen, der nach der CD1a-Expression in Abb. 19 zu urteilen, eher der LC als der IDEC-Population entspricht.

3.3 Funktionelle Untersuchungen epidermaler dendritischer Zellen

Dendritische Zellen sind funktionell vor allem über ihre Antigen-präsentierenden Eigenschaften definiert. Die Expression kostimulatorischer Moleküle gilt als Voraussetzung für eine Zelle, diese Aufgabe zu vollziehen. Daher wurde auch für die dendritischen Zellen der entzündlich veränderten Epidermis die Expression kostimulatorischer Moleküle exemplarisch untersucht. Es zeigte sich, daß bereits frisch isolierte IDEC B7-Moleküle exprimieren.

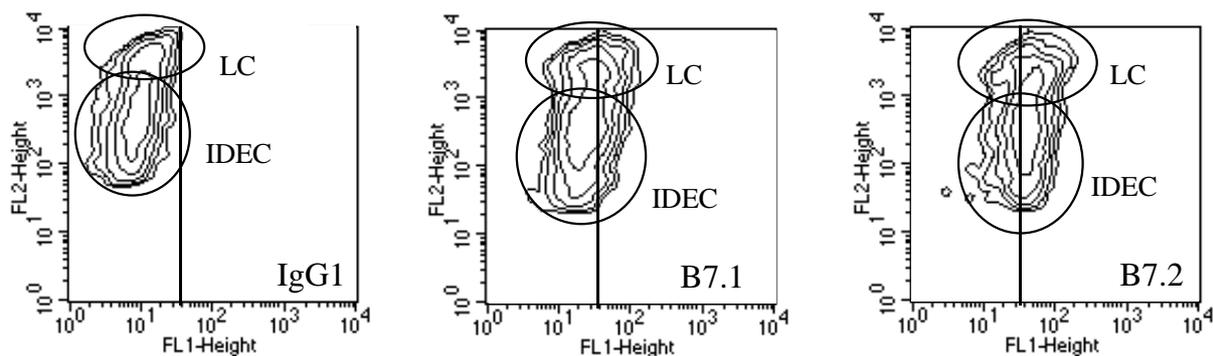


Abb. 21: Contour Plot-Analyse frisch isolierter LC und IDEC aus entzündlicher Haut

Die kostimulatorischen Moleküle CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) werden in entzündlich veränderter Haut bereits auf frisch isolierten LC und IDEC exprimiert.

Um die zellbiologische Bedeutung dieser Expression zu belegen, wurden auch funktionelle Untersuchungen an n=6 Proben durchgeführt. Die gemischte Haut-Lymphozyten-Reaktion ist dabei die am häufigsten angewandte Untersuchungsmethode. Die Zellen wurden hierzu wie unter 2.2 und 2.8 beschrieben analysiert. Es zeigte sich, daß die Stimulationsindices bei Proben, die bei Kulturnahme mit dem CD86-Antikörper versetzt wurden, relativ zur Kontrolle stark zurückgingen.

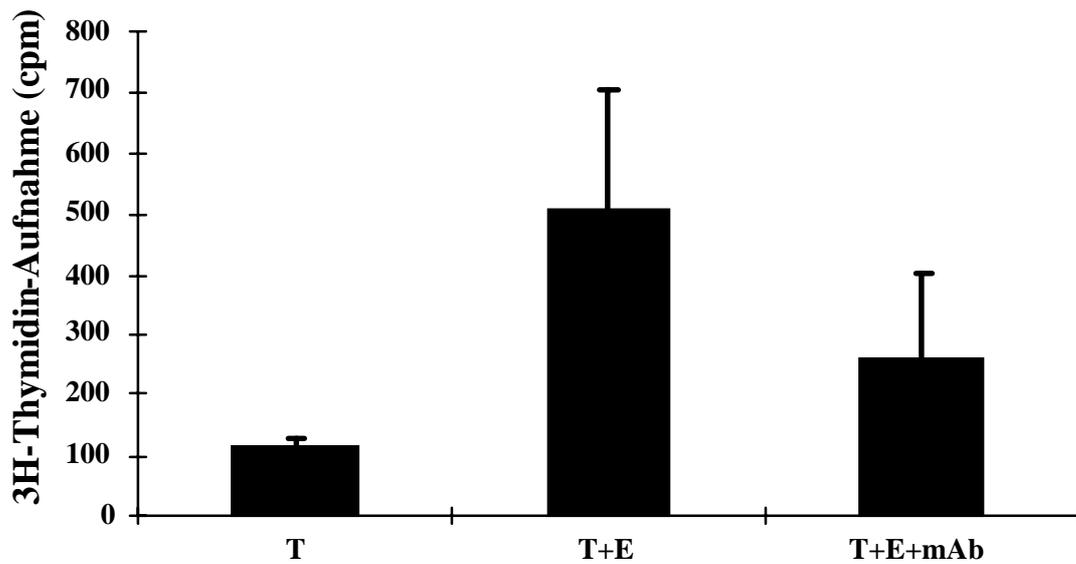


Abb. 22: Epidermale dendritische Zellen stimulieren ihre autologen Lymphozyten in der gemischten Haut-Lymphozytenreaktion

Epidermale Zellsuspensionen wurden aus entzündlicher Haut präpariert und als Stimulatorzellen in einer gemischte Haut-Lymphozyten-Reaktion eingesetzt. Die Ergebnisse der über den Thymidineinbau gemessenen Proliferation (Zerfälle pro Minute, cpm) ist für reine T-Zellen ohne Stimulatorzellen (T), T-Zellen mit epidermalen Stimulatorzellen (T+E) und T-Zellen mit epidermalen Stimulatorzellen unter Blockade des CD86 mit einem Antikörper bei 6 unabhängigen Experimenten (mean±SEM) gezeigt. Die Blockierung von CD86 reduzierte die stimulatorische Kapazität der epidermalen dendritischen Zellen.

4 Diskussion

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit sollten Methoden zur Untersuchung epidermaler dendritischer Zellen aus Zellsuspensionen entzündlicher Haut etabliert werden, um eine vergleichende Untersuchung dieser Zellen in normaler und entzündlich veränderter Haut mit durch Kurzzeitkultur aus Monozyten gewonnenen MoDC zu ermöglichen.

Es zeigte sich dabei eine weitgehende Übereinstimmung des Immunphänotyps von IDEC mit unreifen MoDC, die sich insbesondere auf Integrinketten, kostimulatorische Moleküle, homing Rezeptoren, den Thrombospondinrezeptor und das nicht-klassische MHC-Molekül CD1b erstreckte. Im Gegensatz dazu zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den IDEC und MoDC einerseits und den frisch isolierten LC, sowie den frisch isolierten Monozyten andererseits. Die Ausreifung der Monozyten zu MoDC ließ sich durch Veränderungen der Kulturbedingungen modifizieren.

Der Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Etablierung einer durchflußzytometrischen Methode zur Zellzyklusanalyse und der Beurteilung eines Zelllinien-basierten Modells für die gemischten Zellpopulationen entzündlicher und normaler Haut. Hierbei konnten durch Kontrolluntersuchungen, die durch Veränderung der Zellkonzentration, der Lagerungsdauer der Farbstoffe, der Geräteeinstellung des Durchflußzytometers und der Art der Fixierung der Zellen erzielten Effekte identifiziert und in ihrer Stärke eingeschätzt werden. Insbesondere zeigte sich, daß bereits einzelne Tropfen der EDTA-haltigen Hüllstromflüssigkeit des Durchflußzytometers die Fluoreszenzintensität der gefärbten Proben veränderte, was einen Austausch der normalerweise verwandten, kommerziellen EDTA-haltigen Hüllstromflüssigkeit zu PBS hin notwendig machte. Im Endergebnis konnte eine DNA-Analysetechnik aufgebaut werden, die eine Vitalfärbung, DNA-Färbung und Oberflächenfärbung miteinander kombinierte und so eine Analyse der epidermalen dendritischen Zellen aus Hautbiopsien ermöglichte. Für alle Versuche erwies sich ein im Prozentsatz frei einstellbares Gemisch von CD1a negativen U937-Zellen und CD1a positiven Molt4-Zellen als Modell für die Keratinozyten und dendritischen Zellen der Haut als sehr geeignet. Nach Etablierung der Methodik an den Zelllinien wurden auch Vorversuche an normaler und entzündlich veränderter Haut vorgenommen, die einen normalen Zellzyklus der Keratinozyten und epidermalen dendritischen Zellen aufzeigten.

Abschließend wurden funktionelle Untersuchungen der Stimulationskapazität mittels einer gemischten Haut-Lymphozyten-Reaktion durchgeführt. Diese zeigten einen Einfluß des kostimulatorischen Moleküls CD86 auf die Funktion der epidermalen dendritischen Zellen.

4.1 Der Immunphänotyp der IDEC entspricht weitgehend dem der MoDC

Die auch in normaler Haut nachweisbaren Langerhans Zellen können als antigenpräsentierende Zellen mit dendritischer Morphologie definiert werden, welche ultrastrukturell durch die spezifischen tennisschlägerförmigen Birbeck Granula und immunphänotypisch durch ihre CD1a Expression bei fehlender CD11b Expression charakterisiert sind [52]. Neben den klassischen Langerhans Zellen enthält entzündliche Haut eine weitere CD1a-positive Zellpopulation. Diese inflammatorischen dendritischen epidermalen Zellen (IDEC) sind als in der Epidermis lokalisierte CD1a- und CD11b- positive Zellen mit dendritischer Morphologie definiert, welche ultrastrukturell durch das Fehlen der tennisschlägerförmigen Birbeck Granula charakterisiert sind [52]. Die Benennung der von Langerhans Zellen abzugrenzenden IDEC beruht auf morphologischen und lokalisations-spezifischen Eigenschaften. Sie sind in entzündlicher Epidermis regelmäßig nachweisbar. In der vorliegenden Arbeit wurde herausgearbeitet, inwieweit sich IDEC und MoDC in ihrem Immunphänotyp gleichen.

Die Herstellung von MoDC ist eine etablierte Methode [35], für die bislang kein klares *in vivo* Korrelat bekannt ist. Die aus der entzündlichen Haut isolierten IDEC scheinen diesen Zellen zu entsprechen, jedoch ist deren Ontogenese noch unklar. Es war daher von Interesse, einen möglichst exakten Vergleich des Immunphänotyps der MoDC und IDEC vornehmen zu können, um damit einen Hinweis auf die mögliche Identität zu erlangen. Um MoDC und IDEC unter möglichst gleichen Bedingungen zu analysieren, wurden sämtliche Arbeitsschritte der Immunfärbung sowie die gesamte Analysetechnik einschließlich der Geräteeinstellung des Durchflußzytometers, das sogenannte setting, für MoDC und IDEC identisch gehalten.

Zur Gewinnung der epidermalen Zellsuspensionen - und damit der IDEC - ist jedoch ein enzymatischer Verdauungsschritt mit Trypsin notwendig. Die Protease Trypsin spaltet dabei während der Zellvereinzelnung Proteine auf der Zelloberfläche. Dies kann in Abhängigkeit von Trypsinkonzentration, Temperatur und Zelldichte zu einer teilweisen oder vollständigen Abspaltung des distalen Teils eines bestimmten Oberflächenmoleküls führen. Je nach Bindungsstelle des Antikörpers kann das jeweilige Molekül dann nicht mehr nachweisbar sein oder auch in seiner Funktion beeinträchtigt werden. Deshalb ist es wesentlich, diese Empfindlichkeit für jedes zu untersuchende Molekül zu kennen. Von einzelnen Molekülen wie CD23 ist eine Trypsinempfindlichkeit bekannt [50], andere Moleküle wie CD1a, Fc ϵ RI oder Fc γ RII sind trypsinresistent [51]. Kontrolluntersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigten, daß CD83 und CD64 trypsinempfindlich sind, während CD115, CD80 und CD86 nicht trypsinempfindlich sind. Sofern die aufgrund ihrer quantitativen Resultate viel

aussagekräftigere durchflußzytometrische Methodik verwandt wird [53] müssen sich die Untersuchungen auf die trypsinresistenten Moleküle beschränken.

Die *in vitro* gewonnenen MoDC weisen bei konstanten Kulturbedingungen einen zwar geringgradig vom Spender abhängigen, jedoch insgesamt relativ gut reproduzierbaren Immunphänotyp auf. Für die aus der Haut isolierten Zellen ist jedoch eine weitere Einflußgröße, die Hauterkrankung, zu berücksichtigen. Während der Immunphänotyp der LC in Abhängigkeit von der Hauterkrankung nur geringgradige Schwankungen aufweist, ist er bei den IDEC starken Schwankungen unterworfen. Diese Schwankungen sind bereits Gegenstand immundermatologischer Untersuchungen gewesen. Das sicherlich wichtigste, auch bereits diagnostisch genutzte Beispiel [53] stellt die Expression des FcεRI-Rezeptors auf den IDEC dar, der beim atopischen Ekzem stark aufreguliert ist [54]. Weitere Oberflächenmoleküle wie die IgG-Rezeptoren scheinen bei der Psoriasis vulgaris stärker auf den IDEC exprimiert zu werden [49]. Somit ist auch bei der Diagnoseabhängigkeit für jedes einzelne Oberflächenmolekül zu prüfen, ob eine diagnoseabhängige Regulation vorliegt.

Werden die einzelnen Moleküle unter dem Gesichtspunkt des Immunphänotyps von MoDC und IDEC verglichen, so stellte sich heraus, daß sich die Expression der Oberflächenmoleküle CD11a, CD11b, CD11c, CD80, CD86, CLA, CD1b und CD36 auf MoDC und IDEC sehr stark ähnelte. Einige dieser Oberflächenmarker sind für die Einwanderung von Zellen in die Epidermis unerlässlich. Der wesentlichste Marker CLA war bei MoDC wie auch IDEC identisch aufreguliert. Kawamura et al. und Ohki et al. [22, 28] zeigten, daß DC aus atopischer Haut kosimulatorische Moleküle exprimieren. Diese Arbeiten unterschieden jedoch nicht zwischen LC und IDEC und gingen von der mittlerweile widerlegten Annahme aus, daß es sich bei allen CD1a-exprimierenden Zellen entzündlich veränderter Epidermis um LC handele [47]. Die Daten von Schuller et al. bestätigten die Expression kostimulatorischer Moleküle auf epidermalen dendritischen Zellen [36].

Somit kann festgestellt werden, daß der Immunphänotyp der durch IL4 und GM-CSF erhaltenen MoDC stark dem der IDEC ähnelt. Das für epidermale Adhäsion zuständige Molekül E-Cadherin ist das einzige, welches auf IDEC vorkommt und nicht auf MoDC gefunden wird. Die verbleibenden Unterschiede könnten dadurch bedingt sein, daß die Kultivierung der MoDC nach der Methode der Arbeitsgruppe von Lanzavecchia [35] die Ausreifung *in vivo* nicht exakt nachahmen kann, da einzelne Kofaktoren wie extrazelluläre Matrixproteine fehlen. Die LC hingegen wiesen einen von MoDC deutlich unterschiedlichen Immunphänotyp auf, was sich insbesondere an der unterschiedlichen CD11b, CD11c, CD36, und CD1b-Expression zeigte.

Die Inkubation frisch isolierter Monozyten in GM-CSF und IL4 enthaltendem Medium ist eine hinreichende Voraussetzung, um unreife MoDCs zu gewinnen. Um die Hypothese zu untermauern, daß es sich bei IDEC um in vivo entstandene unreife MoDCs handelt, wäre der Nachweis von GM-CSF und IL4 im epidermo-dermalen Kompartiment entzündlich veränderter Haut wesentlich. Keratinozyten sind eine Quelle für GM-CSF in entzündlicher Haut. Im atopischen Ekzem ist die GM-CSF-Produktion der Keratinozyten noch höher [30]. De Saint-Vis und Mitarbeiter stellten fest, daß unreife dendritische Zellen, die von CD14 positiven Zellen abstammten, selbst GM-CSF produzieren [14]. Als Quellen des IL4 kommen die Mastzellen in Betracht, die in großer Anzahl beim atopischen Ekzems in der Dermis nachweisbar sind. Es ist wahrscheinlich, daß in vivo noch weitere Einzelfaktoren im Zytokinmilieu des epidermo-dermalen Kompartiments wesentlich für die Ausreifung der MoDC sind.

Die Kultivierung der MoDC aus PBMC ist ein artifizieller Vorgang, der in vivo sicher unter ungleich komplexeren Bedingungen stattfindet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden PBMC in GM-CSF und IL4 kultiviert, um ein einfaches Zytokinmilieu zu schaffen, ohne daß weitere Zytokine, die in vivo vielleicht an der Ausreifung beteiligt wären, Einfluß nehmen konnten. Dem in einigen Versuchen anstelle des IL4 zugesetzten IL13 konnte keine Änderung des Immunphänotyps nachgewiesen werden. Dies wurde erwartet, da bekannt ist, daß IL13 an denselben Rezeptor bindet wie IL4 [15]. Weitere Untersuchungen werden zeigen, ob durch eine Optimierung der Kulturbedingungen eine bessere Identität des Immunphänotyps von MoDC und IDEC zu erlangen ist.

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten unreifen MoDC entsprechen vom Immunphänotyp her weitestgehend den IDEC und nicht den LC. Wenn eine Unterscheidung von LC und IDEC möglich war, zeigten sich stets IDEC als die Zellpopulation, welche eher eine den MoDC entsprechender Expression von Oberflächenmolekülen aufwies. Dies unterstützt unsere Hypothese, daß es sich bei IDEC um eine besondere Art von MoDC des epidermo-dermalen Kompartiments handelt.

4.2 Einordnung der eigenen Methodik der DNA -Untersuchungen

Die Untersuchungsmethode zur Analyse des Zellzyklus stellte einige Anforderungen. Es sollten epidermale Zellen aus normaler und entzündlicher Haut durchflußzytometrisch untersucht werden. Auch war eine schnelle Verarbeitung der Haut zu Zellsuspensionen erforderlich. Hierzu wurden in Vorversuchen statt epidermaler Zellsuspensionen gut charakterisierte Zelllinien benutzt, die den Vorteil boten, in beliebigen Mengen nachzuchtbar und einsetzbar zu sein. Die Zelllinien MOLT4 und U937 waren dazu gut geeignet, da MOLT4-Zellen das LC-spezifische Oberflächenantigen CD1a tragen, und somit als Modell für LC dienen konnten, und U937 CD1a negativ sind, und sich mit ihnen die Population der Keratinozyten nachahmen ließ [23].

Zur quantitativen DNA-Untersuchung wurde die durchflußzytometrische Analysemethode gewählt. Der Vorteil der Durchflußzytometrie liegt in der einfachen Durchführung der Färbungen, sei es die Oberflächenfärbung zur immunphänotypischen Identifizierung der jeweiligen Zellen, oder die DNA-Färbung zur Lebend-Tot-Differenzierung des Zellmaterials. Durch diese unterschiedlichen elektronischen Filtermechanismen war es möglich, die Zellen zu selektieren, die lebend, CD1a positiv oder negativ waren, und damit selektiv zur Analyse gelangen konnten. Auch die praktische und schnelle quantitative Zellanalyse wird bei der Durchflußzytometrie als Vorteil betrachtet. Das Immunfluoreszenzmikroskop hat den Nachteil, daß es nur qualitative Aussagen über die jeweilige Zellpopulation liefert [32].

Die besondere Herausforderung bei DNA-Messungen stellt die Erreichbarkeit und Anfärbbarkeit der Nukleinsäure dar. Da vitale Zellen eine für die meisten DNA-Farbstoffe nahezu undurchdringliche Doppellipidschicht als Zellmembran besitzen, mußten die Zellen permeabilisiert und gleichzeitig fixiert werden. In diesem Schritt werden jedoch die Oberflächen der Zellen durch teilweise aggressive Detergenzien und Fixierungslösungen verändert, sodaß eine Gegenfärbung an der Oberfläche zur Zellidentifizierung nicht mehr funktioniert. Um dies zu vermeiden, müssen Detergens, Fixierungslösung und Reihenfolge der Färbeschritte sorgfältig ausgewählt werden. In der vorgelegten Arbeit wurde eine Paraformaldehydfixierung in einer Konzentration von 4% durchgeführt, da damit eine homogene Färbung erzielt wurde, und gut auswertbare DNA-Kurven zustande kamen. Andere Autoren bevorzugten eine Kombination aus Paraformaldehyd (PFA) in niedrigerer Konzentration (0,25%) mit Methanol, da eine Erhöhung der PFA-Konzentration mit einer Abnahme der Propidiumjodid-Färbeintensität und mit einem höheren Variationskoeffizienten (CV) einhergeht. Die Konzentration von PFA wurde so niedrig gewählt, weil bei höheren Konzentrationen eine Aneuploidie, also eine Abweichung des normalen DNA-Gehalts,

nachzuweisen war, und damit das Ergebnis verfälschte [31]. Allerdings wurden hier keine MOLT4/U937-Zelllinien oder epidermale Zellen verwendet, sondern GM 131 Lymphoblasten, weshalb ein direkter Vergleich nicht möglich ist. Die Fixierungstemperatur von 25°C wurde beibehalten. Als Nachteil wird bei Aldehyden wie PFA jedoch die hohe Autofluoreszenz betrachtet.

SYTOX Green wurde als DNA-Farbstoff für die Nukleinsäuren der vitalen Zellen gewählt, da es mehrere Vorteile bietet. Es belegt im Gegensatz zu Propidiumjodid nur einen Fluoreszenzkanal (F11) im Durchflußzytometer. Zugleich ist es gut quantitativ färbend und erreicht so einen niedrigeren Variationskoeffizienten als andere DNA-Farbstoffe. Weitere Vorteile sind die nur geringe Anfärbung des Zytoplasmas, der geringe Zeitaufwand für die Färbung und die fehlende Anfärbbarkeit der RNA.

Eine Vitalfärbung mit dem im Kanal 3 (F13) rot fluoreszierenden 7-AAD wurde in den Versuchen vorgeschaltet, um Artefakte durch tote Zellen zu vermeiden. 7-AAD bindet selektiv an die GC-Regionen des Chromatins und ist wegen der Emission im Durchflußzytometer bei 647 nm besonders geeignet zur Analyse bei Mehrfachfärbungen wie bei den Untersuchungen dieser Arbeit. Somit konnten tote Zellen durch einen Färbeschritt eliminiert werden. Auch Propidiumjodid wurde als DNA-Farbstoff zur Lebend-Tot-Differenzierung anstelle von 7-AAD in Betracht gezogen, kam aber nicht zum Einsatz, da Propidiumjodid nicht nur mit DNA, sondern auch mit der hitzestabilen RNA reagiert. Ein weiterer Schritt zur Elimination der RNA mittels RNase wäre nötig gewesen. Mit 7-AAD als Farbstoff konnte darauf verzichtet werden. Außerdem belegt PI aufgrund des weiten Emissionsspektrums zwei Kanäle (Fluoreszenz 2 und 3) am Durchflußzytometer und war somit für die notwendige Erfassung dreier Parameter nicht geeignet.

Um sinnvolle quantitative DNA-Messungen am Durchflußzytometer durchführen zu können, müssen einige Voraussetzungen erfüllt sein. Zur Standardisierung einer Methode ist es wichtig, daß bestimmte Parameter wie Zellzahl, Konzentrationen der DNA-Farbstoffe und Lagerung der einzelnen Lösungen konstant gehalten werden. Einige Artefakte wie Fluoreszenzintensitätsunterschiede bei unterschiedlichen Zellzahlen oder unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen waren bekannt, andere nicht. So war es notwendig, die Hüllstromflüssigkeit, die zur Kalziumelimination im Durchflußzytometer Di-Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure (Di-Na-EDTA) enthält, durch PBS zu ersetzen, und auch die nur begrenzt haltbare SYTOX-Lösung zu jedem Versuch neu herzustellen. Schließlich wurde eine Methode etabliert, die reproduzierbare Ergebnisse bezüglich der zu untersuchenden Zellen bot, und stabil in der Ausführung war.

4.3 Teilen sich LC und IDEC innerhalb der Epidermis?

Neben einem veränderten Zytokinmilieu ist die erniedrigte Transitzeit der Keratinozyten besonders beim Krankheitsbild der Psoriasis von 28 Tagen auf 3 bis 4 Tage bekannt [8].

Unsere DNA-Messungen an CD1a positiven (MOLT4) und CD1a negativen (U937) Zelllinien waren reproduzierbar und wurden somit als Modell für epidermale Zellsuspensionen verwendet. Für die größte Zellpopulation der Epidermis, den Keratinozyten, die etwa 98% ausmachen, ergab sich ein Wert von $5,25\% \pm 2,34$ in der S/G2M-Phase in normaler Haut. Czernielewski und Mitarbeiter fanden in normaler Haut sich teilende Keratinozyten in der S-Phase von 2,5-3,9% und 1,4-3,3% in der G2M-Phase [13]. Bei den Untersuchungen in der vorgelegten Arbeit konnte aus technischen Gründen die S- von der G2M-Phase nicht getrennt voneinander beurteilt werden. Dennoch liegen beide Ergebnisse im gleichen Bereich. Parent et al. fanden 5,1% der Keratinozyten in der S-Phase, wobei seine Arbeitsgruppe eine ^3H -Thymidin Inkorporation und S100-Protein Immunperoxidasefärbung benutzte, um LC von Keratinozyten zu unterscheiden [29]. In Proben mit normalen epidermalen Zellsuspensionen wurden im Rahmen dieser Arbeit Zellzykluswerte gefunden, die mit den Werten anderer Arbeitsgruppen vergleichbar waren.

Die Untersuchungen an LC in der vorliegenden Arbeit ergaben eine Teilungsrate in normaler Haut von $7,7\% \pm 0,85$. Der Anteil der sich teilenden LC in normaler Haut, lag bei Parent et al. bei 4,02% [29]. Czernielewski et al. fanden 1,3-3,3% der LC in der S-Phase und 1,0-2,5% in der G2M-Phase mittels Durchflußzytometrie. Seine Arbeitsgruppe selektierte LC im Cell-Sorter mittels CD1a-spezifischen Antikörpern. Durch verschiedene Färbetechniken (Ethidiumbromid, mikroskopische Feulgen-Technik) wurde die DNA markiert, und am Durchflußzytometer ausgewertet [13]. Außerdem wurde die Zellteilungszeit am Mausmodell mit 16,3 Tagen extrapoliert und wäre damit mehr als doppelt so hoch wie bei menschlichen Keratinozyten [12]. Der Autor trennt nach S- und G2M-Phase, was bei den Messungen der vorgelegten Arbeit nicht möglich war, da der Anteil der LC in der Epidermis nur etwa 2% ausmacht, sodaß in die endgültige Statistik beide Phasen miteinbezogen wurden. Der Nachteil, der sich aus dieser Betrachtungsweise ergibt, ist, daß sich in der G2M-Phase auch Zellen befinden können, die nicht an der Mitose teilnehmen, und sich vorübergehend im Ruhezustand befinden. Die unterschiedlichen Teilungsraten in den verschiedenen Arbeitsgruppen lassen sich am ehesten durch die unterschiedlichen Untersuchungstechniken erklären. Die Zellsuspensionen der vorgelegten Arbeit, sind zu einem kleinen Teil keine reinen Einzelzellsuspensionen mehr, da durch die unterschiedlichen Färbe- und Waschschr

einzelne Zellen an anderen Zelloberflächen adhärent geworden sind. Somit erkennt das Durchflußzytometer ein aus zwei Zellen bestehendes Konglomerat, auch als Doublette bezeichnet, als nur eine Zelle an, und ordnet diese dann in eine Phase des Zellzyklus ein, in der sie sich in Wirklichkeit nicht befindet. Daß Doubletten nicht richtig eingeordnet werden können, kann durch ein Doubletten-Differenzierungsmodul (DDM), das in einigen Durchflußzytometern vorhanden ist, ausgeschaltet werden. Das in der Klinik vorhandene Durchflußzytometer erlaubt eine DDM –Analyse jedoch nur im Fluoreszenzkanal F12 und nicht im SYTOX-spezifischen Fluoreszenzkanal F11, in dem die SYTOX-markierten Doubletten hätten differenziert werden können.

Die begrenzte Verfügbarkeit und das limitierte Material von entzündlichen Hautproben erschwerte die DNA-Messungen in einer Weise, daß von den Proben mit entzündlicher Epidermis in der vorliegenden Arbeit eine Probe zur Auswertung gelangte. Diese Untersuchung ergab bei einem allergischen Kontaktekzem eine Teilungsrate der Keratinozyten in der S/G2M-Phase von 9,9%, die im Vergleich zur normalen Haut (5,25%) deutlich erhöht ist. Bei LC war der Anteil sich teilender Zellen bei 11,7% einzuordnen. Auch hier wurden S- und G2M-Phase gemeinsam analysiert. Der Anteil der sich teilenden LC in entzündlicher Haut war, wie auch bei den Keratinozyten, im Vergleich zur normalen Haut erhöht. Das ist möglicherweise durch einen erhöhten Zellumsatz zu erklären, alternativ ist eine erhöhte Doublettenrate zu diskutieren. Exakte Zellzyklusangaben zu den verschiedenen entzündlichen Hauterkrankungen liegen in der Literatur nicht vor. Die biologische Schwankungsbreite ist bereits anhand der wenigen untersuchten Proben offensichtlich. Deshalb sind für einen exakten Vergleich Reihenuntersuchungen mit größerer Fallzahl in der nun etablierten Methodik notwendig.

4.4 Epidermale dendritische Zellsuspensionen stimulieren autologe Lymphozyten

Durch ihre Antigen-präsentierenden Eigenschaften sind dendritische Zellen funktionell definiert. Wie bereits unter 4.1 diskutiert, ist die Expression kostimulatorischer Moleküle eine zentral wichtige Voraussetzung zur Antigenpräsentation und Initiierung einer Immunantwort. Kawamura und Ohki zeigten schon 1995 und 1997, daß DC aus läsionaler Haut des atopischen Ekzems kostimulatorische Moleküle exprimieren, und daß eine T-Zell-Proliferation durch den CD86 Antikörper gehemmt werden kann [22, 28]. Schuller et al. zeigten, daß bei verschiedenen Dermatosen die höchste *in situ*-Expression kostimulatorischer Moleküle (CD80/CD86) im atopischen Ekzem beobachtet wurde. Außerdem wurde festgestellt, daß IDEC die relevante Zellpopulation ist, die CD80 und CD86 *in situ* exprimiert, und nicht LC [36]. Dies gibt Anlaß zur Annahme, daß IDEC beim atopischen Ekzem hyperstimulatorisch sind. Bekannt ist, daß das Gemisch von LC und IDEC in der entzündlichen Haut hyperstimulatorisch ist [42], und daß die relevanten Stimulatoren in der normalen Haut die LC sind [41]. Die Arbeitsgruppe von Cooper hat Antigen-präsentierende Zellen charakterisiert, die in das perivaskuläre Gewebe der Epidermis eindringen und T-Zellen stimulieren können [27, 37]. Dies läßt die Annahme zu, daß sowohl LC als auch IDEC Antigen-präsentierende Zellen sind, die möglicherweise aus dem Blut in das Zielgewebe, wie zum Beispiel die Epidermis, eindringen.

5 Zusammenfassung

Die entzündlich veränderte Epidermis unterscheidet sich von der Epidermis der normalen Haut durch das Auftreten einer zweiten dendritischen, von Langerhans Zellen (LC) abgrenzbaren Zellpopulation. Während Herkunft und Funktion dieser Inflammatorischen Dendritischen Epidermalen Zellen (IDEC) noch unbekannt sind, deuten die bislang durchgeführten immunphänotypischen Untersuchungen auf eine Monozyten-abhängige Genese hin. In der vorgelegten Arbeit wurden Untersuchungen an verschiedenen epidermalen Zellsuspensionen, sowie in vitro aus Monozyten hergestellten unreifen dendritischen Zellen (MoDC) durchgeführt, um durch eine standardisierte Untersuchung weiterführende Erkenntnisse zur Immunbiologie dieser dendritischen Zellen zu gewinnen.

Zunächst konnte gezeigt werden, daß die in vitro hergestellten MoDC immunphänotypisch relativ genau den IDEC entsprechen, während der Immunphänotyp der LC deutliche Unterschiede zu dem der MoDC aufweist: Während sowohl IDEC als auch MoDC stark CD36, CD11b und CLA exprimieren, sind auf LC CD36 und CD11b nur minimal und CLA deutlich weniger stark exprimiert. Außerdem konnte gezeigt werden, daß die CD1a-Expression der MoDC mit längerer Kulturdauer stärker wird, und daß eine Zugabe von autologem Serum in die Kultur diese Ausreifung von Monozyten zu MoDC hemmt.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich mit vergleichenden Zellzyklusuntersuchungen von LC und Keratinozyten aus normaler und entzündlich veränderter Haut. Hierzu wurde zunächst eine Untersuchungsmethode zur gleichzeitigen Bestimmung von Zellzyklus, CD1a-Expression und Vitalität etabliert. Es wurden verschiedene Parameter wie Zellzahl, Farbstoffkonzentration, Fixierung und Vitalfärbung an einem auf den Zelllinien MOLT4 und U937 basierenden Modell optimiert, und später auf epidermale Zellsuspensionen übertragen. Dieses aus einem Zellgemisch einer CD1a-exprimierenden und einer CD1a-negativen Zelllinie in seinen Anteilen frei wählbare Modell erlaubte die Optimierung der Färbetechnik und wies den vermehrten DNA-Gehalt der MOLT4-Zellen nach, was auf eine chromosomale Aberration in der MOLT4-Zelllinie hindeutet. Keratinozyten und Langerhans Zellen wiesen einen normalen Zellzyklus innerhalb der normalen Haut auf, was die Resultate anderer Arbeitsgruppen bestätigte. In entzündlicher Haut war die Zellteilungsrate bei Keratinozyten und epidermalen dendritischen Zellen erhöht. Die erhöhte Zellteilungsrate der epidermalen dendritischen Zellen war bislang noch nicht untersucht worden.

Schließlich wurden funktionelle Untersuchungen der immunphänotypisch nachgewiesenen kostimulatorischen Moleküle durchgeführt. Hierzu wurde die antigenpräsentierende Funktion

mit der gemischten Haut-Lymphozyten-Reaktion untersucht. Durch den CD86 Antikörper konnte eine T-Zell-Proliferation in vitro effektiv gehemmt werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit eine Methode zur Untersuchung epidermaler dendritischer Zellen etabliert werden. IDEC ähneln in zahlreichen Aspekten den MoDC, wogegen LC deutliche Unterschiede aufweisen. Weitere Untersuchungen am Zellzyklus entzündlicher Haut, die auf die in der vorgelegten Arbeit etablierten Methode aufbauen, werden Aufschluß über die Teilungsraten von LC und IDEC geben. Anhand der Erkenntnisse über die Rezeptorexpression auf IDEC und MoDC ist eine genauere immunbiologische Einordnung der IDEC in die Gruppe der myeloiden dendritischen Zellen wahrscheinlich.

6 Literatur

1. Banchereau J, Steinman RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252
2. Bata Csorgo Z, Hammerberg C, Voorhees JJ, Cooper KD (1993) Flow cytometric identification of proliferative subpopulations within normal human epidermis and the localization of the primary hyperproliferative population in psoriasis. *J Exp Med* 178: 1271-1281
3. Berman B, Chen VL, France DS, Dotz WI, Petroni G (1983) Anatomical mapping of epidermal Langerhans cell densities in adults. *Br J Dermatol* 109: 553-558
4. Bieber T (1992) IgE-Rezeptoren auf Langerhans Zellen. *Hautarzt* 43: 753-762
5. Bieber T, de la Salle H, Wollenberg A, Hakimi J, Chizzonite R, Ring J, Hanau D, de la Salle C (1992) Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI). *J Exp Med* 175: 1285-1290
6. Bieber T, Rieger A, Neuchrist C, Prinz J, Rieber E, Boltz-Nitulescu G, Scheiner O, Kraft D, Ring J, Stingl G (1989) Induction of FcεR2/CD23 on human epidermal Langerhans cells by human recombinant Interleukin-4 and gamma interferon. *J Exp Med* 170: 309-314
7. Boyum A (1968) Separation of leucocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab Invest* 21: 77-89
8. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff H (1996) *Dermatologie und Venerologie*. Springer, Berlin; S. 545
9. Breathnach A (1963) The distribution of Langerhans cells within the human follicle and some observations on its staining properties with gold chloride. *J Anat* 97: 73-80
10. Bruijnzeel-Koomen C, van Wichen DF, Toonstra J, Berrens L, Bruijnzeel PL (1986) The presence of IgE molecules on epidermal Langerhans cells in patients with atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 278: 199-205
11. Caux C, Dezutter-Cambuyant C, Schmitt D, Banchereau J (1992) GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360: 258-261
12. Czernielewski J, Demarchez M (1987) Further evidence for the self-reproducing capacity of Langerhans cells in human skin. *J Invest Dermatol* 88: 17-20
13. Czernielewski J, Vaigot P, Prunieras M (1985) Epidermal Langerhans cells - A cycling cell population. *J Invest Dermatol* 84: 424-426
14. de Saint-Vis B, Fugier-Vivier I, Massacrier C, Gaillard C, Vanbervliet B, Ait-Yahia S, Banchereau J, Liu Y, Lebecque S, Caux C (1998) The cytokine profile expressed by

- human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *J Immunol* 160: 1666-1676
15. de Waal Malefyt R, Figdor C, Huijbens R, Mohan-Peterson S, Bennett B, Culpepper J, Dang W, Zurawski G, de Vries J (1993) Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10. *J Immunol* 151: 6370-6381
 16. Denfeld RW, Kind P, Sontheimer RD, Schopf E, Simon JC (1997) In situ expression of B7 and CD28 receptor families in skin lesions of patients with lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40: 814-821
 17. Jakob T, Saitoh A, Udey MC (1997) E-cadherin-mediated adhesion involving Langerhans cell-like dendritic cells expanded from murine fetal skin. *J Immunol* 159: 2693-2701
 18. Jaksits S, Kriehuber E, Charbonnier AS, Rappersberger K, Stingl G, Maurer D (1999) CD34+ cell-derived CD14+ precursor cells develop into Langerhans cells in a TGF-beta 1-dependent manner. *J Immunol* 163: 4869-4877
 19. Jimbow K, Sato S, Kutika A (1969) Langerhans cells of the normal human pilosebaceous system. An electron microscopic investigation. *J Invest Dermatol* 52: 177-180
 20. Kashihara M, Masamichi U, Horiguchi Y, Furukawa F, Hanaoka M, Imamura S (1986) A Monoclonal antibody specifically reactive to human Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 87: 602-607
 21. Katz SI, Tamaki K, Sachs DH (1979) Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in the bone marrow. *Nature* 282: 324-326
 22. Kawamura T, Furue M (1995) Comparative analysis of B7-1 and B7-2 expression in Langerhans cells: differential regulation by T helper type 1 and T helper type 2 cytokines. *Eur J Immunol* 25: 1913-1917
 23. Kiriya Y, Kubota M, Takimoto T, Kitoh T, Tanizawa A, Akiyama Y, Mikawa H (1989) Biochemical characterization of U937 cells resistant to L-asparaginase: the role of asparagine synthetase. *Leukemia* 3: 294-297
 24. Kraal G, van Wilsem E, Breve J (1993) The phenotype of murine Langerhans cells from skin to lymphnode. *In vivo* 7: 203-206
 25. Kull U, Knodel H (1980) *Genetik und Molekularbiologie*. J.B. Metzlersche Verlagsbuchhandlung und Carl Ernst Poeschel Verlag GmbH, Stuttgart; S. 127
 26. Langerhans P (1868) Über die Nerven der menschlichen Haut. *Arch Pathol Anatom* 44: 325-337

27. Meunier L, Gonzalez RA, Cooper KD (1993) Heterogeneous populations of class II MHC+ cells in human dermal cell suspensions. Identification of a small subset responsible for potent dermal antigen-presenting cell activity with features analogous to Langerhans cells. *J Immunol* 151: 4067-4080
28. Ohki O, Yokozeki H, Katayama I, Umeda T, Azuma M, Okumura K, Nishioka K (1997) Functional CD86 (B7-2/B70) is predominantly expressed on Langerhans cells in atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 136: 838-845
29. Parent D, Godfrine S, Dezutter-Dambuyant C, Staquet MJ, Heenen M, Schmitt D, Thivolet J (1989) In situ identification of cycling Langerhans cells in normal human skin. *Arch Dermatol Res* 281: 75-77
30. Pastore S, Fanales Belasio E, Albanesi C, Chinni LM, Giannetti A, Girolomoni G (1997) Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is overproduced by keratinocytes in atopic dermatitis. Implications for sustained dendritic cell activation in the skin. *J Clin Invest* 99: 3009-3017
31. Pollice A, Mc Coy P, Jr., Shackney S, Smith C, Agarwal J, Burholt D, Janocko L, Hornicek F, Singh S, Hartsock R (1992) Sequential Paraformaldehyde and Methanol Fixation for Simultaneous Flow Cytometric Analysis of DNA, Cell Surface Proteins, and Intracellular Proteins. *Cytometry* 13: 432-444
32. Raffael A (1988) Grundlagen der analytischen Durchflußzytometrie. *Labor Medizin* 11: 89-97
33. Romani N, Lenz A, Glassel H, Stanzl H, Majdic O, Fritsch P, Schuler G (1989) Cultured human Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotype and function. *J Invest Dermatol* 93: 600-609
34. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A (1995) Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182: 389-400
35. Sallusto F, Lanzavecchia A (1994) Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by Granulocyte/Macrophage colony stimulating factor plus Interleukin 4 and downregulated by Tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179: 1109-1118
36. Schuller E, Teichmann B, Haberstok J, Moderer M, Bieber T, Wollenberg A (2001) In situ-expression of the costimulatory molecules CD80 and CD86 on Langerhans cells and

- inflammatory dendritic epidermal cells (IDEC) in atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 293:448-454
37. Shibaki A, Meunier L, Ra C, Shimada S, Ohkawara A, Cooper K (1995) Differential responsiveness of Langerhans cell subsets of varying phenotypic states in normal human epidermis. *J Invest Dermatol* 104: 42-46
 38. Silberberg-Sinakin I, Thorbecke G, Baer R, Rosenthal S, Berezowsky V (1976) Antigen-bearing Langerhans cells in skin, dermal lymphatics and in lymph nodes. *Cell Immunol* 25: 137-151
 39. Steinman RM (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9: 271-296
 40. Stingl G, Katz S, Clement L, Green I, Shevach E (1978) Immunologic functions of Ia-bearing epidermal Langerhans cells. *J Immunol* 121: 2005-2013
 41. Streilein JW (1983) Skin-associated lymphoid tissues (SALT): origin and functions. *J Invest Dermatol* 80 Suppl: 12s-16s
 42. Taylor RS, Baadsgaard O, Hammerberg C, Cooper KD (1991) Hyperstimulatory CD1a+CD1b+CD36+ Langerhans cells are responsible for increased autologous T lymphocyte reactivity to lesional epidermal cells of patients with atopic dermatitis. *J Immunol* 147: 3794-3802
 43. van Wilsem E, Breve J, Kleijmeer M, Kraal G (1993) Antigen-bearing Langerhans cells in skin draining lymph nodes: phenotype and kinetics of migration. *J Invest Dermatol* 103: 217-220
 44. Wang B, Rieger A, Kilgus O, Ochiai K, Maurer D, Födinger D, Kinet J, Stingl G (1992) Epidermal Langerhans cells from normal human skin bind monomeric IgE via FcεRI. *J Exp Med* 175: 1353-1365
 45. Weiss JM, Renkl AC, Denfeld RW, de Roche R, Spitzlei M, Schopf E, Simon JC (1995) Low-dose UVB radiation perturbs the functional expression of B7.1 and B7.2 co-stimulatory molecules on human Langerhans cells. *Eur J Immunol* 25: 2858-2862
 46. Wollenberg A (1998) Isolation and enrichment of human epidermal Langerhans cells. In: Cochet O, Teillaud J, Sautes C (Hrsg) *Immunological techniques made easy*. Wiley, Chichester; S. 20-22
 47. Wollenberg A, Bieber T (1998) Two populations of CD1a+ epidermal dendritic cells expressing B7 molecules in human skin. *Br J Dermatol* 138: 357-373
 48. Wollenberg A, de la Salle H, Hanau D, Liu FT, Bieber T (1993) Human Keratinocytes release the endogenous β-galactoside-binding soluble lectin eBP which binds to

- Langerhans cells where it modulates their binding capacity for IgE glycoforms. *J Exp Med* 178: 777-785
49. Wollenberg A, Haberstock J, Schuller E, Teichmann B, Bieber T (1999) Upregulation of Fcγ receptors on epidermal dendritic cells is specific for Psoriasis vulgaris. *Arch Dermatol Res* 291: 153
 50. Wollenberg A, Haberstock J, Teichmann B, Wen S, Bieber T (1998) Demonstration of the low affinity IgE Receptor FcεRII/CD23 in psoriatic epidermis: Inflammatory dendritic epidermal cells but not Langerhans cells are the relevant CD1a-positive cell population. *Arch Dermatol Res* 290: 517-521
 51. Wollenberg A, Kraft S, Hanau D, Bieber T (1996) Immunomorphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema. *J Invest Dermatol* 106: 446-453
 52. Wollenberg A, Schuller E (1999) Langerhans Zellen und Immunantwort. In: Plewig G, Wolff H (Hrsg) Fortschritte der praktischen Dermatologie und Venerologie. Springer, Berlin, S. 41-48
 53. Wollenberg A, Wen S, Bieber T (1995) Langerhans cell phenotyping: A new tool for differential diagnosis of inflammatory skin diseases. *Lancet* 346: 1626-1627
 54. Wollenberg A, Wen S, Bieber T (1999) Phenotyping of epidermal dendritic cells - clinical applications of a flow cytometric micromethod. *Cytometry* 37: 147-155

7 Anhang

7.1 Kulturmedien und Lösungen

7.1.1 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ xH ₂ O	1,5 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Aqua dest.	ad 1000,0 ml

Der pH der Lösung wurde mit 1 M NaOH und 1 M HCl auf pH 7.35 eingestellt.

7.1.2 FACS-Puffer

Unsteriler PBS	1000,0 ml
Inaktiviertes fetales Kälberserum (Fa. Boehringer)	10,0 ml
10% Na-Azid-Lösung (Fa Merck, Darmstadt)	10,0 ml

Alle Zusätze über einen 0,2 µm Sterilfilter zugeben

7.1.3 Saponin-Waschpuffer

Hank'sche Lösung (Fa. Gibco)	500,0 ml
Saponin (Fa. Sigma, St. Louis, USA)	0,5 g
FKS, inaktiviert	10,0 ml

Alle Zusätze über einen 0,2 µm Sterilfilter zugeben

7.1.4 Langerhans-Zellen-Waschmedium

RPMI1640 ohne Glutamin (Fa. Seromed, Berlin, D)	500,0 ml
L-Glutamin (Fa. Gibco)	5,0 ml
Antibiotische/Antimykotische Lösung (Fa. Gibco)	5,0 ml
FKS, inaktiviert	50,0 ml

Alle Zusätze über einen 0,2 µm Sterilfilter zugeben

7.1.5 Monozyten-Waschmedium

Bovines Albumin (Fa. Sigma)	5,0 g
1 M EDTA-Lösung	0,85 ml
NaCl	4,5 g
Aqua bidest.	ad 500,0 ml

Alle Zusätze über einen 0,2 µm Sterilfilter zugeben

7.1.6 Monozyten-Kulturmedium

Kulturmedium wie unter 7.1.4 beschrieben	100,0 ml
GM-CSF (Leucomax, Fa. Sandoz, Basel, Schweiz)	4,5 µl
Interleukine 4/13 (recombinant, Fa. Gibco)	10,0 µl

7.1.7 Lymphozyten Waschmedium/Kulturmedium

RPMI 1640 (Fa. Seromed)	500,0 ml
Hepes-Puffer 1 M (Fa. Gibco)	10,0 ml
MEM-Vitamine (Fa. Gibco)	5,0 ml
Nichtessentielle Aminosäuren (Fa. Gibco)	5,0 ml
L-Glutamin (Fa. Gibco)	10,0 ml
Antibiotische/Antimykotische Lösung (Fa. Gibco)	5,0 ml
FKS, inaktiviert	50,0 ml

Alle Zusätze über einen 0,2 µm Sterilfilter zugeben

7.1.8 0,5% Trypsin-Lösung

PBS def.	1000,0 ml
Trypsin (Fa. Sigma, Typ XI)	5,0 g

Auf dem Magnetrührer lösen, pH auf 7,2-7,4 einstellen, steril filtrieren und aliquotiert bei – 20°C lagern

7.1.9 0,1% DNase-Lösung

PBS def.	250,0 ml
DNase, bovine (Fa. Sigma, Typ IV)	250,0 mg

Zusätze über einen 0,2 µm Sterilfilter zugeben, aliquotieren à 4,0 ml und bei –20°C lagern.

7.1.10 Paraformaldehyd-Lösung (4%)

Paraformaldehyd (Fa. Sigma)	4,0 g
PBS (s. 7.1.1)	100,0 ml

Zutaten auf 60°C erwärmen, bis Lösung völlig klar ist; über einen 0,2µm Sterilfilter filtrieren und bei 4°C dunkel lagern

7.1.11 Dextran-Lösung (6%)

Dextran (Fa. Sigma)	15,0 g
NaCl	2,25g
Aqua bidest.	ad 250,0 ml

Zutaten mischen, 1h rühren und autoklavieren; bei 4°C dunkel lagern; Lösung ist maximal 3 Monate haltbar.

7.1.12 Hypotone Kochsalzlösung

Aqua bidest.	100,0 ml
PBS def.	ad 400,0 ml

Alle Zusätze über einen 0,2µm Sterilfilter zugeben

7.2 Antikörper und Seren zur Bestimmung der Rezeptor-Expressionen

Name /Klon	Isotyp	Spezifität	Herkunft	
29C6	IgG1	FcεRIα	J. Hakimi	
IV.3	IgG2b	CD32/FcγRII	Medarex	
4.A7.6	IgG2a	CD1b	Immunotech	
9P.25	IgG1	CD23	Immunotech	
IOP36	IgG1	CD36	Immunotech	
25.3.1	IgG1	CD11a	Immunotech	
BEAR1	IgG1	CD11b	Immunotech	
BU15	IgG1	CD11c	Immunotech	
3G8	IgG1	CD16/FcγRIII	Immunotech	
HP2/1	IgG1	CD49d/VLA4	Immunotech	
E124.2.8	IgG1	IgE	Immunotech	
10.1	IgG1	CD64/FcγRI	Calbiochem	
L307.4	IgG1	CD80/B7.1	Camfolio	
IT2.2	IgG1	CD86/B7.2	Pharmingen	
HB15A	IgG2b	CD83	Immunotech	
HECD-1	IgG1	E-Cadherin	Zymed	
3-4A4-E4	rIgG2b	CD115	Calbiochem	
HECA-452	rIgM	CLA	L. Poulter	
RMO52	mIgG2a	CD14	Immunotech	
D547	mIgG1	Mannose-Rez.	A. Lanzavecchia	
B9.11	mIgG1	CD8	Immunotech	
J4.119	mIgG1	CD19	Immunotech	
BL2	mIgG2b	HLA-DR	Immunotech	
GaM	mIgG	mFcγ	FITC	Jackson
Mausserum	∅	∅	∅	Sigma
Rattenserum	∅	∅	∅	Sigma
T6RD1	IgG1	CD1a	PE	Coulter
IgG1RD1	mIgG1	∅	PE	Coulter

CD14	mIgG1	CD14	PE	Becton Dickinson
CD11b	mIgG1	CD11b	FITC	Immunotech
CD3	mIgG	CD3	FITC	Becton Dickinson

8 Danksagung

Allen, die diese Arbeit ermöglicht und zu dieser beigetragen haben, sage ich herzlichen Dank.

Diese Dankbarkeit richtet sich zunächst an

- Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. G. Plewig für die Möglichkeit in der Dermatologischen Klinik forschen zu können
- Herrn PD Dr. med. A. Wollenberg, der mich in die Labortätigkeit im Labor für Immunbiologie ausführlich in alle Techniken einführte, der hilfsbereit und unermüdlich bei Fragen und Problemen jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand, und mich mit unendlich viel Engagement und Motivation bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützte
- Frau Dr. E. Schuller, Herrn Dr. T. Oppel, Frau Dr. K. Kerschenlohr, Herrn J. Haberstock und den anderen Mitdoktoranden für die Hilfe und Organisation im Labor für Immunbiologie
- meiner wunderbaren Familie für die großartige Unterstützung während meines gesamten Studiums und der Zeit der Erstellung dieser Arbeit und ganz besonders meiner Mutter, die meine Arbeit mit großem Interesse gelesen und korrigiert hat
- Frau E. Müller-Sander für die wertvolle Hilfe bei organisatorischen Fragen im Labor und schließlich
- Frau Multhaup, Frau Nau, Frau Orthgiess und Frau Urban für die freundliche Unterstützung am Durchflußzytometer im Serologischen Labor

9 Lebenslauf

Personalien

Name	Martina Moderer
Geburtsdatum	25.10.1971
Geburtsort	Marburg/Lahn
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Eltern	Margitta Moderer, Med.Techn. Angestellte Wilfried Moderer, Diplom-Verwaltungswirt

Schulbildung

1978-1982	Grundschule Dreihausen
1982-1988	Gymnasium Elisabethschule, Marburg/Lahn
1989	Austauschjahr: Kepnock State High School, Bundaberg, Queensland, Australien, mit Abschluß High School Certificate
1990-1992	Gymnasium Philippinum, Marburg/Lahn
1992	Abitur
1992-1993	Sprachaufenthalt in Brisbane, Queensland, Australien

Studium

1993-1994	Humanmedizin an der Universität Regensburg
1994-2000	Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
März 1996	Ärztliche Vorprüfung
März 1997	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
16.09.1999	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09.10.2000	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruf

seit 01.03.2001	Ärztin im Praktikum in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der LMU München
-----------------	--