

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 Expression von Chemokinrezeptoren
auf Langerhans-Zellen und
Inflammatorischen dendritischen epidermalen Zellen (IDEC)
in normaler und in entzündlich veränderter Haut**

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

vorgelegt von
Sandra Decard
aus München
2005

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: PD Dr. med. A. Wollenberg

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. G. Enders

PD Dr. med. R. Gruber

Prof. Dr. med. S. Endres

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Februar 2005

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Konzept dendritischer Zellen	1
1.2 Kutane dendritische Zellen und ihre Rolle bei entzündlichen Hauterkrankungen	2
1.3 Chemokine	3
1.4 Chemokinrezeptoren	4
1.5 Chemokinrezeptoren auf humanen dendritischen Zellen	6
1.6 Fragestellung	7
2. Material und Methodik	8
2.1 Herkunft der Proben	8
2.2 Reagenzien	9
2.3 Zellgewinnung	9
2.3.1 Monozyten	9
2.3.2 Monocyte-derived dendritic cells (MoDC)	10
2.3.3 Einzelzellsuspension von Epidermalzellen	10
2.4 Vitalitätsprüfung	11
2.5 Kulturnahme von Epidermalzellen und MoDC	11
2.6 Durchflußzytometrische Untersuchungen	12
2.6.1 Durchführung der indirekten Dreifarbenfluoreszenzfärbung	12
2.6.2 Durchflußzytometrische Analyse der Zellsuspensionen	12
2.7 Statistische Berechnungen	14
2.8 Immunhistochemische Färbungen mit der Alkalische-Phosphatase- Anti-Alkalische-Phosphatase-Reaktion (APAAP)	14

3. Ergebnisse	16
3.1 Das Chemokinrezeptor-Expressionsmuster normaler Langerhans-Zellen verändert sich im Rahmen der isolationsbedingten Ausreifung	16
3.2 In entzündlich veränderter Haut weisen die Langerhans-Zellen ein verändertes Chemokinrezeptor-Expressionsmuster auf	20
3.3 Die maturationsassoziierten Veränderungen der Chemokinrezeptor-expression auf Langerhans-Zellen sind in normaler Haut und bei atopischem Ekzem gleichartig	20
3.4 Inflammatorische dendritische epidermale Zellen weisen ein von Langerhans-Zellen unterschiedliches Chemokinrezeptor-Expressionsmuster auf	21
3.5 Inflammatorische dendritische epidermale Zellen regulieren in der Kurzzeitkultur ihre CXCR-4-Expression signifikant herauf, während CCR-5 und CCR-6 signifikant herabreguliert werden	25
3.6 Diagnoseabhängigkeit des Chemokinrezeptor-Expressionsmusters auf dendritischen Zellen in entzündlich veränderter Haut	25
3.7 Monozyten und MoDC als Modelle kutaner dendritischer Zellen und ihrer Vorläufer	29
3.7.1 MoDC exprimieren lediglich CCR-5, Monozyten exprimieren am stärksten CCR-2, CXCR-2 und CXCR-4	29
3.7.2 Alle untersuchten Zelltypen weisen eigenständige Charakteristika hinsichtlich der Chemokinrezeptorexpression auf	31
3.8 Mit TNF- α oder LPS inkubierte MoDC regulieren CCR-5 herab und behalten die sehr geringe Expression von CCR-6 und CCR-7 bei	34
4. Diskussion	35
4.1 Die durch Isolation induzierte Reifung epidermaler Langerhans-Zellen beinhaltet auch Veränderungen der Chemokinrezeptor-Expression	35
4.2 Die in der Literatur beschriebenen Expressionsunterschiede zwischen normaler und entzündlich veränderter Epidermis bei CCR-6 und	

CCR-7 auf epidermalen dendritischen Zellen könnten durch das Hinzutreten der IDEC erklärt werden	36
4.3 Die Trypsinempfindlichkeit des CXCR-2 bedingt falsch negative Untersuchungsergebnisse in der durchflußzytometrischen Analyse	37
4.4 Die signifikant höhere Expression von CXCR-3 auf IDEC bei atopischem Ekzem ist möglicherweise von funktioneller Bedeutung für die Pathogenese der Erkrankung und ihrer Komplikationen	37
4.5 IDEC stellen eine eigenständige Zellpopulation dar, die nicht durch Reifung aus den LC hervorgehen, sondern aus der Blutbahn in die Epidermis einwandern	38
5. Zusammenfassung	41
6. Literatur	43
7. Anhang	48
7.1 Verwendete Reagenzien und ihre Zusammensetzung	48
7.2 Danksagung	54
7.3 Lebenslauf	55

Verzeichnis im Text häufig verwendeter Abkürzungen

7-AAD	7-Amino-Actinomycin D
AE	atopisches Ekzem
APAAP	alkalische Phosphatase anti alkalische Phosphatase
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
CD	cluster of differentiation
CXCR	CXC-Chemokin-Rezeptor
DC	dendritische Zelle(n)
EH	entzündliche Haut
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FcεRI	hochaffiner IgE-Rezeptor
FcγRII	niedrigaffiner IgG-Rezeptor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
IDEC	Inflammatorische dendritische epidermale Zelle(n)
LC	Langerhans-Zelle(n)
LC/EH	Langerhans-Zellen in entzündlicher Haut
LC/NH	Langerhans-Zellen in normaler Haut
LPS	Lipopolysaccharid
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MoDC	aus Monozyten generierte dendritische Zelle(n)
NH	normale Haut
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
rFI	relative Fluoreszenzintensität
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha

1. Einleitung

1.1 Das Konzept dendritischer Zellen

Dendritische Zellen (DC) sind in vielen Organen des menschlichen Körpers zu finden. In der Haut formen sie ein Netzwerk und spielen eine zentrale Rolle bei der Auseinandersetzung des Körpers mit Fremdanitigenen. Sie entstammen dem Knochenmark, gehören wie die Monozyten und Makrophagen zu den zur Phagozytose fähigen Zellen und sind in der Lage, Antigene aufzunehmen und zu präsentieren. All diese Zellen tragen den Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex II (MHC-II) auf ihrer Oberfläche. DC exprimieren zusätzlich die Oberflächenmarker CD1a, CD11c und kostimulatorische Moleküle wie CD40 und CD86 [3]. Sie besitzen mikroskopisch sichtbare baumartige Zellausläufer, die denen der Nervenzellen ähneln und daher als Dendriten bezeichnet werden. Unter anderem deshalb wurden sie früher fälschlicherweise dem Nervensystem zugerechnet [19].

Ihre Aufgabe besteht zunächst in der Prozessierung, das heißt Aufnahme und Zerkleinerung, von Fremdanitigenen. Daraufhin wandern die unreifen DC in den Lymphbahnen in Richtung Lymphknoten aus und verändern währenddessen ihren Phänotyp zu reifen Zellen hin. Im Lymphknoten angekommen, präsentieren die nun reifen DC die Antigenfragmente zusammen mit ihrem MHC-II-Molekül an Lymphozyten, die darauf unter anderem zur Synthese und Ausschüttung von Zytokinen angeregt werden [38].

DC sind nicht nur zur sekundären, sondern auch zur primären Immunantwort fähig. Sekundäre Immunantworten richten sich gegen bereits bekannte Antigene und können durch viele Zellarten ausgeführt werden. Dabei werden die Antigenfragmente antigen-spezifischen Lymphozyten präsentiert. Die Befähigung zur Induktion einer primären Immunantwort ist bisher lediglich für DC gezeigt worden und bedeutet, dass eine Immunantwort auch gegen solche Antigene induziert werden kann, mit denen das Immunsystem zum ersten Mal in Kontakt gerät. Hierbei findet durch DC eine Präsentation der Antigenfragmente an naive T-Zellen statt [38].

1.2 Kutane dendritische Zellen und ihre Rolle bei entzündlichen Hauterkrankungen

Die Haut ist das größte Organ des Menschen und stellt eine physikalische, chemische sowie immunologische Abwehrbarriere dar. Die beiden obersten Schichten Epidermis und Dermis sind durch eine Basalmembran voneinander abgegrenzt. Die Epidermis als äußerste Schicht besteht aus mehreren Zellschichten und dabei größtenteils aus Keratinozyten. In den höheren Epidermisschichten, als suprabasal bezeichnet, finden sich die dendritischen, antigen-präsentierenden Langerhans-Zellen (LC), welche in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts entdeckt und nach ihrem Erstbeschreiber Paul Langerhans benannt wurden [19].

Im Zytoplasma der LC finden sich elektronenmikroskopisch sichtbare, tennisschlägerförmige Zellorganellen, die nach ihrem Erstbeschreiber als Birbeck-Granula bezeichnet werden und deren genaue Funktion noch unklar ist [6] [23]. Frisch isolierte LC sind unreif und exprimieren das nicht-klassische MHC-Molekül CD1a, die Immunglobulin-Rezeptoren FcεRI und FcγRII (CD32) sowie die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VLA-4, E-Cadherin und CD11c [38] [43]. Der Anteil der LC an allen Zellen der nicht entzündlich veränderten Epidermis beträgt lediglich 1 bis 2 %.

In entzündlich veränderter Haut sind CD1a-positive Zellen epidermal mit bis zu 5 % vertreten, der Rest der Zellen entfällt mit etwa 90 % größtenteils auf Keratinozyten [43]. Hier findet sich zusätzlich eine weitere Art DC, die im Vergleich zu den LC etwas weniger CD1a auf ihrer Oberfläche tragen. Im Gegensatz zu den LC exprimieren sie das Adhäsionsmolekül CD11b sehr stark. Diese Zellen wurden erst vor wenigen Jahren von den LC abgegrenzt und als Inflammatorische dendritische epidermale Zellen (IDEC) bezeichnet. Sie unterscheiden sich von den LC auch durch ein Fehlen der Birbeck-Granula [42].

DC sind an der Infekt- und Tumorabwehr und bei vielen akuten und chronischen entzündlichen Hauterkrankungen zentral beteiligt. Das atopische Ekzem (AE), auch Neurodermitis genannt, ist eine chronisch rezidivierende, entzündliche Hauterkrankung aus dem atopischen Formenkreis, die vor allem in den großen Gelenkbeugen rote, schuppige Maculae oder infiltrierte erythematöse Plaques mit vergrößerter Hautfalterung verursacht und mit starkem Juckreiz einhergeht. Die Erkrankung beruht wahrscheinlich auf einer fehlgeleiteten Immunantwort im Zusammenspiel mit einer Barriestörung der Epidermis. Man nimmt dabei an, dass harmlose Aeroallergene oder Nahrungsmittelallergene durch DC an T-Zellen präsentiert werden, die in der Folge B-Zellen zur Produktion spezifischer IgEs anregen. Die IgE-Moleküle können an einen hochaffinen IgE-Rezeptor (FcεRI) an der Oberfläche der DC binden [5] [39]. Dies erleichtert den DC die Präsentation der

aufgenommenen Allergene. Wie sich in der Immunphänotypisierung zeigen ließ, führt die IgE-Bindung gleichzeitig zu einer starken Erhöhung der Expression von FcεRI, wodurch wiederum mehr spezifisches IgE binden kann. Es resultiert ein selbstverstärkender Regelkreis [5].

Die auch Schuppenflechte genannte Psoriasis vulgaris bewirkt ebenfalls rote, entzündlich infiltrierte, silbrig-weiß schuppene Plaques an der Haut, weist aber selten Juckreiz auf. Die Prädispositionsstellen sind die Streckseiten der Extremitäten, besonders Ellbogen und Knie sowie die Analfalte und die Kopfhaut. Durch einen psoriatischen Befall des Nagelbettes können auch die Finger- und Zehennägel in Form von Tüpfelnägeln und Ölflecken verändert sein. Bei der Psoriasis kommt es aus noch ungeklärter Ursache zu einer als Proliferationshyperkeratose bezeichneten beschleunigten Erneuerung der Epidermis, was klinisch zur Entzündung und Schuppung führt. Auch bei dieser Erkrankung finden sich in den entzündlichen Hautläsionen vermehrt epidermale DC. Sie tragen allerdings weniger IgE-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche als beim AE. Hingegen findet sich vermehrt der niedrigaffine IgG-Rezeptor FcγRII (CD32) sowie der hochaffine IgG-Rezeptor FcγRI (CD64) [45].

1.3 Chemokine

Chemokine sind chemotaktisch wirkende Zytokine, die an zahlreichen Immun- und Entzündungsprozessen beteiligt sind. Sie stellen 8-10 kDa kleine Proteine dar und werden von unterschiedlichen Zellarten produziert und sezerniert, um insbesondere Leukozyten zur gerichteten Migration entlang eines Konzentrationsgradienten anzuregen. Chemokine binden an Glykosaminoglykane, die sich auf der Zelloberfläche befinden. Dadurch werden Chemokine immobilisiert, und man stellt sich vor, dass so überhaupt erst ein Konzentrationsgradient innerhalb der extrazellulären Matrix aufgebaut werden kann [25].

Mittlerweile wird zwischen vier Chemokin-Klassen aufgrund der Stellung zweier Cysteinreste am aminoterminalen Ende des Proteins unterschieden. Eine Gruppe sind die CXC- oder α-Chemokine. Das X steht für eine Aminosäure, die zwischen den beiden ersten Cysteinen liegt. Eine weitere Gruppe stellen die CC- oder β-Chemokine dar, deren beide Cysteine unmittelbar nebeneinander liegen. Die dritte Gruppe sind die C- oder γ-Chemokine, bei denen das erste und das dritte der insgesamt vier Cysteine fehlen. Bei der vierten Gruppe der CX3C-

oder δ -Chemokine befinden sich drei Aminosäuren zwischen den beiden ersten Cysteinen [2] [26].

Innerhalb der CXC-Gruppe gibt es zwei Untergruppen. Bei der einen gibt es eine charakteristische Sequenz aus den drei Aminosäuren Glutamat, Leucin und Arginin (ELR), die unmittelbar nach dem ersten Cysteinrest am aminoterminalen Ende liegt. Bei der zweiten Untergruppe fehlt eine solche ELR-Sequenz. Zur ELR-Untergruppe gehören IL-8 und MIP-2. Sie wirken als Chemoattraktantien und Aktivatoren in erster Linie auf Neutrophile und bewirken deren Degranulation mit Freisetzung von Myeloperoxidasen und anderen Enzymen. Die Nicht-ELR-Untergruppe sowie die CC- und C-Chemokine wirken chemoattraktiv und aktivierend auf Monozyten, dendritische Zellen, B- und T-Lymphozyten, NK-Zellen, Basophile und Eosinophile. Chemokine werden von vielen Zellarten produziert, unter anderem von Monozyten und Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten und Lymphozyten.

Die Anhäufung der Chemokin-Gene auf dem Chromosom 17 lässt annehmen, dass viele der Zytokine durch Genverdopplung zustande gekommen sind. Auch haben Chemokine bisher zahlreiche überlappende und redundante Funktionen *in vitro* gezeigt [26]. Beispielsweise können viele von ihnen nicht nur jeweils an einen spezifischen, sondern an mehrere unterschiedliche Chemokinrezeptoren binden. Ob die einzelnen Chemokine auch *in vivo* redundante Funktionen ausüben, ist noch weitgehend unerforscht.

1.4 Chemokinrezeptoren

Chemokinrezeptoren gehören zur großen Gruppe der an ein G-Protein gekoppelten Rezeptoren und schlängeln sich mit ihrer Proteinkette siebenmal durch die Zellmembran. Rezeptoren, welche CXC-Chemokine binden, werden als CXCR bezeichnet. Analog dazu werden CC-Chemokine bindende Rezeptoren CCR abgekürzt und wie die CXCR nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung mit fortlaufenden Ziffern versehen. Bislang wurden 11 CCR [34] und 6 CXCR [21] [17] sowie ein CR [47] und ein CX3CR identifiziert [15]. Chemokinrezeptoren finden sich auf vielerlei Zellarten des Organismus. Viele der Zellarten exprimieren dabei mehr als nur einen Rezeptortyp, beispielsweise T-Lymphozyten, die mehr als zehn verschiedene Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche tragen. Die meisten der CXCR

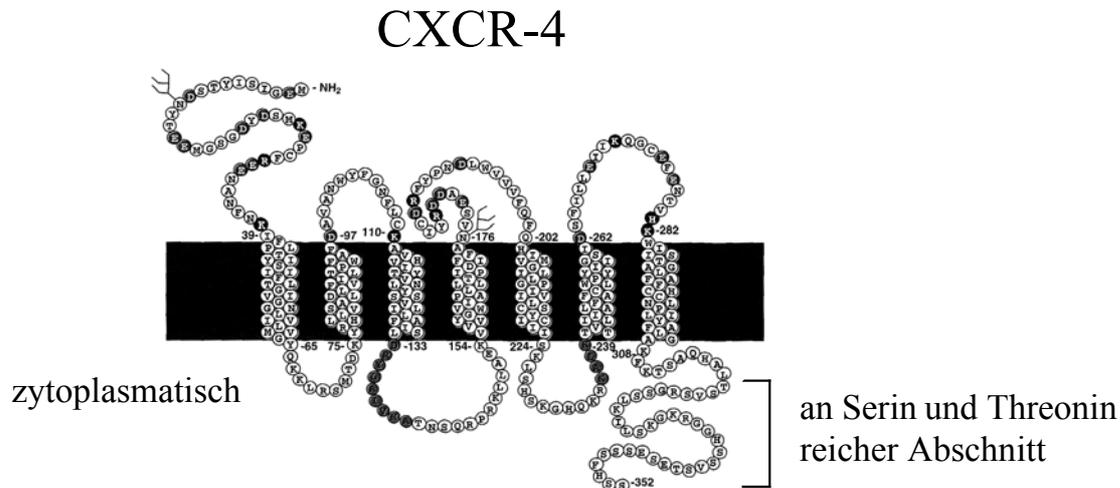


Abb. 1:
Struktur des Chemokinrezeptors CXCR-4
 Modifizierte Abbildung aus [13]

und CCR haben mehrere potentielle Chemokinliganden, die ihrerseits wiederum auch an mehrere andere Chemokinrezeptoren binden können. Beispielsweise sind für CCR-1 vier verschiedene potentielle Liganden bekannt, darunter das Chemokin RANTES, und umgekehrt kann RANTES an vier verschiedene Chemokinrezeptoren binden, nämlich CCR-1, -3, -5 und -9. Auffällig ist, dass in der CXC-Gruppe eine höhere Ligand-Rezeptor-Spezifität herrscht als in der CC-Gruppe [26] [10]. Für CC- und CX3C-Rezeptoren ist nur je ein Ligand bekannt (Lymphotactin und Fractalkine). In Abbildung 1 ist der Rezeptor CXCR-4 als Beispiel für die Struktur der Chemokinrezeptoren dargestellt.

Im Gewebe vorliegende, unreife DC sind in der Lage, Antigene effizient aufzunehmen, nicht aber, Lymphozyten zu aktivieren. Dazu ist zunächst der Durchlauf eines Reifungsvorganges notwendig. Nach Antigenaufnahme reagieren die unreifen DC auf das Chemokin Macrophage inflammatory protein 3 alpha, MIP-3 α . Dies ist ein Ligand für CCR-6, der im entzündeten Gewebe exprimiert wird. Dabei wird einerseits CCR-6 herunterreguliert, die DC können somit nicht mehr so gut auf MIP-3 α reagieren. Andererseits wird CCR-7 heraufreguliert und scheint als Rezeptor für das Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) zu fungieren, das bei der weiteren Wanderung in die lymphatischen Organe beteiligt ist. Dieses Umschalten der Rezeptor- und Chemokinexpression führt zur Wanderung der DC in die lymphatischen

Organe, wo sie die prozessierten Antigene an Lymphozyten präsentieren und diese aktivieren können [46] [32] [12] [29].

Auch bei der Infektion mit dem Humanen Immunodefizienz-Virus 1 (HIV-1) sind Chemokine beteiligt. So wurde CCR-5 auf CD4-positiven Lymphozyten als Co-Rezeptor für HIV-1 identifiziert. Die meisten Menschen können sich mit diesem Virus infizieren. Bei einigen wenigen Menschen jedoch stellte sich nach Kontakt mit dem Virus keine Infektion ein, und es zeigte sich bei zwei genauer untersuchten Personen ein homozygoter Defekt des CCR-5, welcher als Co-Rezeptor für HIV-1 fungiert [1]. Neben CCR-5 sind noch weitere Chemokinrezeptoren bei der Infektion mit HIV-1 beteiligt [8].

Auf Erythrozyten befindet sich ein multispezifischer Chemokinrezeptor, der zahlreiche α - und β -CK binden kann und mit dem Duffy-Blutgruppen-Antigen DARC identisch ist. Er ist bei der Invasion des Malariaerregers *Plasmodium vivax* in die roten Blutzellen beteiligt [14]. Seine Bedeutung hinsichtlich Chemotaxis und Migration von Zellen ist noch unklar.

1.5 Chemokinrezeptoren auf humanen dendritischen Zellen

Die Expression von Chemokinrezeptoren bei humanen DC wurde bislang hauptsächlich mit Hilfe zweier Methoden analysiert. Zum einen wurden RT-PCR oder Northern Blots durchgeführt, um die Ausprägung der Rezeptoren auf mRNA-Ebene nachzuweisen. Zum anderen wurde mittels FACS der direkte Nachweis der Rezeptoren als Proteine auf der Zelloberfläche erbracht.

Auf mRNA-Ebene wurden bislang CCR-1, -2, -3, -5 und CXCR-1, -2, -4 auf Monozyten und auf unreifen, aus Monozyten generierten dendritischen Zellen (MoDC) gefunden, sowie CCR-3, CCR-7 und CXCR-4 auf reifen, das heißt stimulierten MoDC [37] [46] [9]. Auf frisch isolierten epidermalen LC und auf in vitro aus CD34-positiven Zellen des peripheren Blutes generierten CD1a-positiven DC fanden sich CCR-2, CCR-6, CCR-7 und CXCR-4 [7]. Mittels FACS-Analyse zeigten sich CCR-5, CXCR-1 und CXCR-2 auf unreifen MoDC sowie CCR-6 auf CD1a-positiven Vorläufern der LC im Blut (CD34-positive Zellen). CD14-positive DC-Vorläufer im Blut exprimierten CCR-1 und CCR-5. Auf reifen MoDC war CXCR-4 exprimiert [37] [9] [7]. Daten zu der zweiten, nur in entzündlich veränderter Epidermis vorliegenden dendritischen Zellpopulation, den IDEC, liegen bisher nicht vor.

1.6 Fragestellung

Die Expression von Chemokinrezeptoren auf LC in normaler Epidermis ist bereits beschrieben worden [7]. In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst untersucht werden, ob im Vergleich dazu die Expression von CKR auf LC in entzündlicher Epidermis und auf IDEC, die ausschließlich in entzündlicher Epidermis vorkommen, verändert ist. Dabei sollte auch erfasst werden, ob eine zellspezifische Expression von Chemokinrezeptoren vorliegt, das heißt, ob sich Rezeptoren lediglich LC oder IDEC zuordnen lassen. Zudem sollte untersucht werden, ob DC in entzündlich veränderter Epidermis diagnoseabhängige Unterschiede in der Chemokinrezeptor-Expression zeigen.

Desweiteren war von Interesse, ob und in welcher Weise sich die Chemokinrezeptor-Expression auf diesen Zellpopulationen nach 24stündiger Kulturnahme verändert, durch die ein sich während entzündlicher Prozesse in der Haut abspielender Reifungsvorgang *in vitro* nachempfunden werden sollte. Ziel war dabei, Unterschiede in der Expression einzelner Chemokinrezeptoren nach Durchlaufen dieses Reifungsvorganges zu erfassen. Hierbei war insbesondere die Untersuchung der funktionell bedeutsamen Chemokinrezeptoren CCR-6 und CCR-7 von Interesse.

Monozyten gelten als im Blut befindliche Vorläufer dendritischer Zellen; MoDC stellen je nach Kulturbedingungen *in-vitro*-Modelle für unreife und reife DC dar [31] [27] [4] [30]. Diese Modellzellen wurden darauf hin untersucht, wie sie sich während eines Reifungsvorganges verhalten und ob bei ihnen ähnliche Veränderungen der Chemokinrezeptor-Expression stattfinden wie bei reifenden LC oder IDEC. Die Ergebnisse sollten Rückschlüsse auf Herkunft und Funktion der IDEC ermöglichen.

Bekanntermaßen geht die Reifung von MoDC mit einer Herabregulierung von CCR-5 einher [20]. Diese Herabregulierung sollte experimentell nachvollzogen werden und festgestellt werden, ob die Stimulantien TNF- α und LPS ein unterschiedlich starkes Ausmaß der Herabregulierung des Rezeptors CCR-5 bewirken. Desweiteren sollte das Verhalten der funktionell bedeutsamen Chemokinrezeptoren CCR-6 und CCR-7 bei der Reifung von MoDC untersucht werden. Ein Vergleich der Chemokinrezeptor-Expressionsmuster auf MoDC und IDEC sollte klären, ob sich auf den beiden Zellarten ähnliche Expressionsmuster nachweisen lassen, wie dies hinsichtlich anderer Oberflächenmoleküle bereits gezeigt werden konnte [22]. Zur Beantwortung dieser Fragen wurden sowohl durchflußzytometrische als auch immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt.

2. Material und Methodik

2.1 Herkunft der Proben

Die Proben aus entzündlich veränderter Haut wurden von ambulant und stationär behandelten Patienten der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Gerd Plewig) gewonnen. Alle Probanden waren 7 Tage vor Probenentnahme weder äußerlich noch innerlich mit Steroiden oder immunmodulatorischen Macrolactamen behandelt worden. Die Hautbiopsien erfolgten - wie von der zuständigen Ethikkommission begutachtet - nach ausführlicher schriftlicher und mündlicher Aufklärung und schriftlicher Einwilligung der Patienten. Zur Verarbeitung kamen tangentielle Biopsien, die durch oberflächliche Abtragung mittels Dermatom an normaler, das heißt nicht entzündlich veränderter Haut sowie mittels Skalpell an entzündlichen Hautarealen unter sterilen Kautelen vorgenommen wurden. Die Proben aus normaler Haut stammten aus Resten von Spalthaut, die im Rahmen dermatologischer Operationen anfielen. Blutproben zur Isolierung von Monozyten wurden freiwillig von hautgesunden Mitarbeitern des Labors sowie von Patienten mit atopischem Ekzem zur Verfügung gestellt. Alle Proben wurden nach Entnahme unverzüglich bearbeitet. Für bestimmte Fragestellungen wurde zusätzlich die promonozytische Zelllinie U937 eingesetzt [18] [24].

Für die statistische Auswertung nach Diagnosen standen 37 Shave- und Spalthaut-Biopsien zur Verfügung, davon 13 x NH, 7 x Psoriasis vulgaris, 12 x AE, 2 x Eczema herpeticatum bei AE, 2 x nummuläres Ekzem, 1 x hyperkeratotisch-rhagadiformes Handekzem, 1 x kutanes Lymphom und 1 x Mycosis fungoides. Aufgrund der geringen Fallzahlen bei den anderen entzündlichen Hautproben wurden lediglich die Psoriasis- und AE-Proben zur statistischen Auswertung hinsichtlich der Diagnoseabhängigkeit des Chemokinrezeptor-Expressions-musters herangezogen. Unter „entzündliche Hautproben“ wurden die bei sämtlichen entzündlichen Hautproben erhaltenen Ergebnisse zusammengefaßt. Je 8 Proben aus normaler Haut und aus entzündlicher Haut bei atopischem Ekzem wurden einer 24stündigen Kultur unterzogen. Es wurden Monozyten sowie MoDC aus Monozyten 12 verschiedener Blutproben untersucht. Im Falle der entzündlichen Hautproben stand oft nicht die zur gleichzeitigen Untersuchung sämtlicher Chemokinrezeptoren benötigte Zellzahl zur Verfügung, da die Shave-Biopsien in ihrer Größe limitiert waren.

2.2 Reagenzien

Die Einzelbestandteile aller verwendeten Lösungen sowie alle verwendeten Antikörper sind im Anhang wiedergegeben. Zur Sterilfiltration größerer Volumina wurden Einmalfiltrationssysteme mit 0,22 µm Porengröße und 500 ml Flascheninhalt (Fa. Corning, Inc., Corning, New York, USA, Nr. M430769) verwendet.

2.3 Zellgewinnung

2.3.1 Monozyten

Frisch entnommenes peripheres Kalium-EDTA-Venenblut (10 ml ergeben etwa $1-2,5 \times 10^6$ Monozyten) aus S-Monovetten (9 ml, Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Nr. 02.1066.001) wurde unter der sterilen Werkbank in einem 50 ml fassenden sterilen Röhrchen (Fa. Greiner Labortechnik, Nürtingen, Nr. 227261) mit Dextran 6 % (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, Nr. D-5251) gemischt, um die Sedimentierung der Erythrozyten zu beschleunigen. Auf 10 Teile Blut wurde ein Teil 6 %ige Dextran-Lösung gegeben und die Mischung 30 bis 40 Minuten bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen. Nach dem Absinken der Erythrozyten wurde der Überstand mit einer sterilen Pipette abgesaugt, in einem 50 ml-Röhrchen auf die Hälfte des Volumens NycoPrep (Fa. Nycomed Pharma, Oslo, Nr. 1002351) überschichtet und eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt (800 g, RT, 15 Minuten, langsames Anfahren und ungebremstes Auslaufen der Zentrifuge). Tote Zellen, Granulozyten und Erythrozyten sinken hierbei zu Boden, während eine Interphase zwischen NycoPrep und darübergeschichtetem Plasma entsteht, die hauptsächlich Monozyten enthält. Die Interphase wurde vorsichtig restlos abgesaugt und in 40 ml Monozyten-Waschmedium (200 g, RT, 10 Minuten) gespült. Der Überstand wurde abgezogen und verworfen. Anschließend wurden die Zellen weitere zweimal jeweils in 20 ml Waschmedium gespült (200 g, RT, 5 Minuten). Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen mit dem für die jeweilige Verwendung nötigen Medium im entsprechenden Volumen resuspendiert.

2.3.2 Monocyte-derived dendritic cells (MoDC)

Aus den im obigen Abschnitt hergestellten Monozyten wurden innerhalb von sechs Tagen unreife dendritische Zellen generiert. Hierzu wurden Monozyten in einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml Kulturmedium je Well in einer sterilen 24-Well-Mikrotiterplatte (Fa. Costar/Corning, New York, Nr. 3524) unter Zusatz von 2 μ l IL-4 (Interleukin 4, recombinant human, 200 U/ml, Fa. CellSystems, St. Katharinen, Nr.200-04) je 10^6 Zellen und 3 μ l GM-CSF (granulocyte monocyte colony stimulating factor, Leucomax® 150, Wirkstoff Molgramostim 150 μ g, Fa. Novartis, Nürnberg; Konzentration der Arbeitslösung: 167 U/ml) je 10^6 Zellen bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach 48 h wurde jeweils die Hälfte der am Tag der Isolierung eingesetzten Zytokindosen zugegeben. Nach weiteren 48 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, indem in jedem Well 500 μ l des Mediums vorsichtig abgezogen und durch 500 μ l frisches, mit 1 μ l IL-4 und 1,5 μ l GM-CSF versetztes Medium ersetzt wurden. Am sechsten Tag nach Isolierung waren die Zellen üblicherweise am Plattenboden adhären, hatten im Mikroskop durch den Plattenboden sichtbare dendritische Fortsätze ausgebildet, waren CD14-negativ und CD1a-positiv. Nach vollständiger Entfernung der MoDC aus den Wells durch Spülen mit Kulturmedium wurden die Zellen direkt der Immunphänotypisierung zugeführt. Zur terminalen Differenzierung der MoDC wurde der jeweilige Zusatz, zum Beispiel LPS, zum Kulturmedium in das Well gegeben.

2.3.3 Einzelzellsuspension von Epidermalzellen

Die gewonnenen Hautstücke wurden unter der sterilen Werkbank in einer Petrischale mit PBS gereinigt, in einer weiteren Petrischale mit einem Skalpell in 1-2 mm breite Streifen geschnitten, mit 300 μ l Trypsin 0,5 % bedeckt und für 60-90 Minuten bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Durch die Inkubation mit Trypsin erfolgt eine Lösung des Zellverbandes in Höhe der suprabasalen Epidermis. Anschließend ließen sich die beiden Zelllagen mittels zweier Pinzetten voneinander trennen, wobei im Falle der Spalthaut der zäh anmutende, Dermis enthaltende Anteil verworfen und die Epidermis in ein 15 ml-PPN-Röhrchen (Fa. Greiner Labortechnik, Nürtingen, Nr. 188271) mit 2 ml Kulturmedium und 200 μ l DNase (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, Nr. D-5025) gegeben wurde. Nach kurzem kräftigem Mischen auf dem Rüttler wurde 3 Minuten bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Darauf folgten ein einminütiges Mischen auf dem Rüttler und das Filtern der

Gewebssuspension durch ein Polyesternetz mit 50 µm Maschenweite (Laborbedarf Wagner & Munz, München, Nr. 20147), so dass schließlich eine Einzelzellsuspension von Epidermalzellen vorlag, die vor der Weiterverarbeitung einmal bei 250 g in Kulturmedium gewaschen wurde [40].

2.4 Vitalitätsprüfung

Trypanblau diffundiert aus dem umgebenden Medium in das Zytoplasma und kann nur von vitalen Zellen aktiv wieder aus dem Zytoplasma entfernt werden. Der Anteil der toten Zellen in einer Zellsuspension kann somit sichtbar gemacht werden. Hierzu wurden 10 µl der Zellsuspension mit dem gleichen Volumen einer 0,25 %igen Trypanblaulösung gemischt und 10 µl des Gemisches in eine Neubauer-Zählkammer (Fa. Assistent, München) gefüllt. Der prozentuale Anteil der toten Zellen an der Gesamtzellzahl errechnete sich durch Auszählung des Anteils blauer und damit toter Zellen unter dem Durchlichtmikroskop (Fa. Carl Zeiss, Oberkochen), Bildung des Quotienten aus der Zahl toter Zellen und der Gesamtzellzahl und anschließender Multiplikation des Ergebnisses mit 100. Sämtliche zur Analyse gelangten Proben zeigten eine Vitalität der Zellen von über 80 %, die jeweils unmittelbar nach Herstellung der Epidermalzellsuspensionen, Isolierung der Blutzellen oder Entnahme der MoDC aus den Zellkulturplatten gemessen wurde.

2.5 Kulturnahme von Epidermalzellen und MoDC

Aus Biopsien gewonnene Einzelzellsuspensionen von Epidermalzellen wurden in Kulturmedium resuspendiert und in einer 24-Well-Platte 24 h lang inkubiert (37°C, 5 % CO₂, 10⁶ Zellen/ml/Well). Anschließend wurden die Zellen aus den Wells entfernt und immunphänotypisiert. MoDC wurden weitere 48 h mit Stimulantien in der 24-Well-Platte inkubiert und dann phänotypisiert. Zur Anwendung kamen folgende Stimulationsansätze: Bei der Stimulation mit LPS wurden 10 µl der LPS-Arbeitslösung zu 10⁶ Zellen in 1ml Kulturmedium in ein Well gegeben, so dass die Endkonzentration des LPS im Well 100 ng/ml betrug. Für die Stimulation mit TNF-α wurden 10 µl in ein Well zu 10⁶ Zellen in 1 ml Kulturmedium gegeben, so dass die Endkonzentration im Well 10 ng/ml betrug.

2.6 Durchflußzytometrische Untersuchungen

2.6.1 Durchführung der indirekten Dreifarbenfluoreszenzfärbung

Die durchflußzytometrische Analyse folgte einem in der Arbeitsgruppe entwickelten, publizierten Protokoll [45]. Zur Phänotypisierung wurde die jeweilige Einzelzellsuspension in einer Zahl von 200.000 bis 500.000 Zellen im Falle der Epidermalzellen und 50.000 Zellen im Falle der Blutzellen in ein Polystyrol-Rundbodenröhrchen (5 ml Falcon, Becton Dickinson Labware, Meylan, Frankreich, Nr. 352054) gegeben und einmal in 2 ml FACS-Puffer bei 250 g und 4°C gewaschen.

Anschließend wurden die Zellen einer indirekten Dreifarbenfluoreszenzfärbung nach dem folgenden Protokoll unterzogen. Alle Inkubationen wurden bei 4°C lichtgeschützt durchgeführt. Die Waschvorgänge erfolgten jeweils in FACS-Puffer. Die Zellen wurden mit dem spezifischen Primärantikörper gemischt (Endkonzentration 2,5 µg/ml) und 30 Minuten inkubiert. Im zweiten Färbeschritt wurden nun nach einmaligem Waschen der mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) konjugierte Sekundärantikörper zugemischt (Endverdünnung 1:200) und 30 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang wurde in einem dritten Schritt Mäuseserum (Fa. Dianova, Hamburg, Nr. 015-000-120) zur Blockierung freier Bindungsstellen des Sekundärantikörpers in einer Endverdünnung von 1:10 zugegeben und 15 Minuten inkubiert. Im vierten und letzten Inkubationsschritt wurden die Zellen nach erneutem Waschen mit 5 µl einer vorgemischten Lösung versehen und 30 Minuten inkubiert. Diese vorgemischte Lösung bestand im Falle der Epidermalzellen und MoDC aus dem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff 7-Amino-Actinomycin-D (7-AAD) und dem CD1a-spezifischen, Phycoerythrin-konjugierten, monoklonalen Antikörper T6-RD1. Im Falle frischer Monozyten enthielt sie 7-AAD und CD14-PE (s. Anhang). Nach einem letzten Waschschrift lag die Zellsuspension in etwa 100 µl Volumen vor. Die eingesetzten Antikörper sind im Anhang aufgelistet.

2.6.2 Durchflußzytometrische Analyse der Zellsuspensionen

Die Durchflußzytometrie ist eine zuverlässige und hochempfindliche Methode zur Analyse der Zellzahl und zur quantitativen Analyse membranständiger Oberflächenantigene, für die lediglich ein geringes Maß an Material und Färbeaufwand benötigt wird. Für die in

vorliegender Arbeit durchgeführten Analysen wurde das Gerät FACScan® (Firma Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) verwendet. Die gefärbten Zellsuspensionen wurden bis zur durchflußzytometrischen Analyse bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt. Die Einmessung der unfixierten Zellen erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 60 µl/min.

Durch eine Kombination der Parameter Vorwärts- und Seitwärtslichtstreuung (FSC/SSC, linear erfaßt) mit CD1a-PE und 7-AAD (F1-2/F1-3, logarithmisch erfaßt) wurde die Einmessung elektronisch auf die Analyse vitaler, CD1a-positiver Einzelzellen beschränkt. Bei der Analyse der Monozyten wurden über den Größentrigger FSC 80 alle Zellen ab dieser Größe erfaßt. Mit der Software CellQuest wurde der mittlere Fluoreszenzindex (MFI) der im Punkte-Diagramm eingegrenzten Zellpopulationen ermittelt. Die MFI-Werte der verschiedenen Rezeptoren wurden normalisiert, um die quantitativen Resultate für einen Vergleich der Rezeptordichte von tagesbedingten Schwankungen der Geräteeinstellung unabhängig und damit besser vergleichbar zu machen. Dazu wurden die MFI-Werte des zugehörigen Kontrollantikörpers mit einbezogen und die relativen Fluoreszenzindizes (rFI) nach folgender Formel errechnet:

$$\text{rFI} = [\text{MFI (Rezeptor)} - \text{MFI (Kontrolle)}] / \text{MFI (Kontrolle)}$$

Mit der Berechnung der rFI-Werte lassen sich auch größere Unterschiede zwischen den Fluoreszenzindizes zuverlässig wiedergeben. Dies ist ein Vorteil gegenüber der älteren, bei geringeren Unterschieden zwischen den Fluoreszenzindizes häufig verwendeten Angabe in Prozent positiver Zellen [45]. In der grafischen Darstellung entspricht ein rFI-Wert von null dem Übereinanderliegen der zwei Histogrammkurven. Ein rFI-Wert von zehn entspricht einer Verschiebung der Histogrammkurven um eine logarithmische Dekade. In dieser Arbeit wurde von einer relevanten Oberflächenexpression ausgegangen, wenn die rFI-Werte über 0,5 lagen. Falls in der zweidimensionalen graphischen Darstellung mehrere Subpopulationen vorliegen, können deren rFI-Werte durch elektronisches Eingrenzen der einzelnen Zellpopulationen getrennt bestimmt werden. Zur Ermittlung des Anteils CD1a-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl wurde ein Röhrchen mit dem Primärantikörper gegen IgG1 wie oben geschrieben gefärbt, dann mit einem Trigger von FSC 80 eingemessen und der Prozentsatz CD1a-positiver Zellen durch elektronisches Eingrenzen der entsprechenden Subpopulation bestimmt.

2.7 Statistische Berechnungen

Da nicht von einer Normalverteilung der Einzelwerte ausgegangen werden konnte, wurden zur Berechnung der Signifikanzwerte nichtparametrische Tests angewandt. Bei unabhängigen Stichproben kam der Mann-Whitney-U-Test zur Anwendung, bei verbundenen Stichproben der Wilcoxon-Test. Unterschiede wurden bei $p < 0,05$ als signifikant und bei $p < 0,01$ als hochsignifikant bezeichnet. In den Abbildungen sind signifikante Werte mit „*“, hochsignifikante Werte mit „**“ gekennzeichnet.

2.8 Immunhistochemische Färbungen mit der Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Reaktion (APAAP)

Die APAAP-Reaktion wird an 5-8 μm dünnen Kryostatschnitten durchgeführt. Ein monoklonaler, unkonjugierter Primärantikörper bindet an den entsprechenden Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Ein nachfolgend zugegebener unkonjugierter Sekundärantikörper lagert sich an den Primärantikörper an. Mit seinem noch freien Fab-Teil bindet er im nächsten Schritt das Fc-Fragment eines Tertiärantikörpers, der einen löslichen Komplex aus alkalischer Phosphatase und monoklonalen anti-alkalische-Phosphatase-Antikörpern gebunden hat. Eine nachfolgend zugegebene chromogene Substratlösung wird durch die alkalische Phosphatase zu Phenolen und Phosphaten hydrolysiert, welche anschließend mit farblosen Diazoniumsalzen (Chromogenen) unlösliche, intensiv rote Azofarbstoffe bilden. Durch wiederholte Inkubationen mit dem Sekundärantikörper und dem APAAP-Komplex kann die Farbintensität gesteigert werden. Die Zellkerne und das Zytoplasma werden durch anschließende Färbung mit Hämalaun zur besseren Abgrenzung blau dargestellt.

Zunächst wurden die Kryostatschnitte nach etwa einstündigem Trocknen 10 Minuten in Aceton eingelegt, weitere 10 Minuten getrocknet und anschließend 40-60 Minuten mit dem Primärantikörper inkubiert. Nach Spülen mit Tris-Puffer folgte eine 30minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper Rabbit-anti-Mouse (RaM). Nach erneuter Spülung mit Tris-Puffer wurden die Schnitte 30 Minuten mit dem APAAP-Komplex inkubiert. Die Inkubationen mit RaM und APAAP-Komplex wurden zweimal für je 10 Minuten wiederholt. Schließlich wurden die Schnitte 5 Minuten in Tris-Puffer gelegt, danach mit je 50 μl der chromogenen Substratlösung (Sigma Fast Red TR/Naphthol AS-MX Tablettenset; Fa. Sigma, Steinheim, Nr. F-4523) 6-8 Minuten inkubiert, bis die gewünschte Farbintensität erreicht war

und wiederum 5 Minuten in Tris-Puffer gehalten. Jetzt wurden die Objektträger zuerst in destilliertes Wasser eingetaucht, danach 90 Sekunden in Hämalaun gelegt und im Anschluß 5 Minuten in Leitungswasser gehalten. Nach nochmaligem Eintauchen in destilliertes Wasser und Lufttrocknen wurden die Schnitte mit auf 37°C erwärmter Kaiserscher Glycerin-Gelatine (Fa. Merck, Darmstadt, Nr. 9242) und einem Deckglas eingedeckt. Danach erfolgte die morphologische Beurteilung der Schnitte nach Anzahl und Verteilungsmuster positiver Zellen.

Alle Schritte der Färbung wurden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer durchgeführt. Bei jedem Inkubationsschritt wurden 50 µl des jeweiligen Agens auf den Schnitt aufgebracht. Zunächst erfolgte eine Anwendung in einer Antikörperkonzentration von 5 µg/ml im Falle der NH sowie von 10 µg/ml bei AE. Nach Auswertung der auf diese Weise durchgeführten ersten Färbungen wurde eine Angleichung der Konzentration an die gewünschte Farbintensität vorgenommen.

Die Herkunft der Antikörper ist unter 7.1, die eingesetzten Antikörperkonzentrationen für die APAAP-Färbungen sind in Tabelle 1 aufgelistet. Für die APAAP-Färbungen erfolgte die Verdünnung der Antikörper-Stammlösungen mittels DAKO-Antibody-Diluent (Fa. DAKO, Carpinteria, USA, Nr. S3022).

	CCR-1	CCR-2	CCR-3	CCR-4	CCR-5	CCR-6	CCR-7	CCR-9
NH	1:50	1:50	1:40	1:20	1:70	1:100	1:20	1:40
AE	1:50	1:50	1:20	1:20	1:50	1:100	1:20	1:50

	CXCR-1	CXCR-2	CXCR-3	CXCR-4	CXCR-5	CD1a	CD11b
NH	1:40	1:100	1:200	1:50	1:50	1:100	1:100
AE	1:50	1:50	1:1000	1:50	1:50	1:100	1:100

Tab. 1: Für die APAAP-Färbung verwendete Verdünnungen der Antikörper

3. Ergebnisse

3.1 Das Chemokinrezeptor-Expressionsmuster normaler Langerhans-Zellen verändert sich im Rahmen der isolationsbedingten Ausreifung

Vor dem Hintergrund bereits publizierter Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen wurde zunächst die Chemokinrezeptorexpression epidermaler dendritischer Zellen in normaler, nicht entzündlich veränderter Haut untersucht. In der Gegenfärbung mit dem dendritischen Zellmarker CD1a kam immer eine einzelne, homogene Zellpopulation zur Darstellung. Auf frisch isolierten Langerhans-Zellen (LC/NH) war durchflußzytometrisch stets eine starke CCR-6-Expression und in geringer Ausprägung eine CCR-7- und CXCR-3-Expression nachweisbar. Die Abbildung 2 zeigt ein typisches Versuchsergebnis der durchflußzytometrischen Analyse von Chemokinrezeptoren frisch isolierter epidermaler dendritischer Zellen in Histogrammdarstellung.

In den APAAP-Färbungen zeigte normale Haut einige CD1a-positive, dendritisch geformte Zellen in der Epidermis, während sich solche Zellen in der Dermis nur vereinzelt fanden. CD11b, der Marker für IDEC, war wie erwartet epidermal nicht zu sehen. In der Dermis zeigten sich jedoch zahlreiche CD11b-positive, dendritisch geformte Zellen, die man dermalen Makrophagen zuordnen kann. In der Epidermis normaler Haut fanden sich in APAAP-Färbungen von den untersuchten Chemokinrezeptoren lediglich CCR-6 und CXCR-3 auf zahlreichen DC ausgeprägt. Wie erwartet zeigte sich CCR-7 nicht auf LC in normaler Haut. Dermal waren auf wenigen DC CCR-3 und CXCR-4 sowie auf vielen DC CXCR-3 angefärbt.

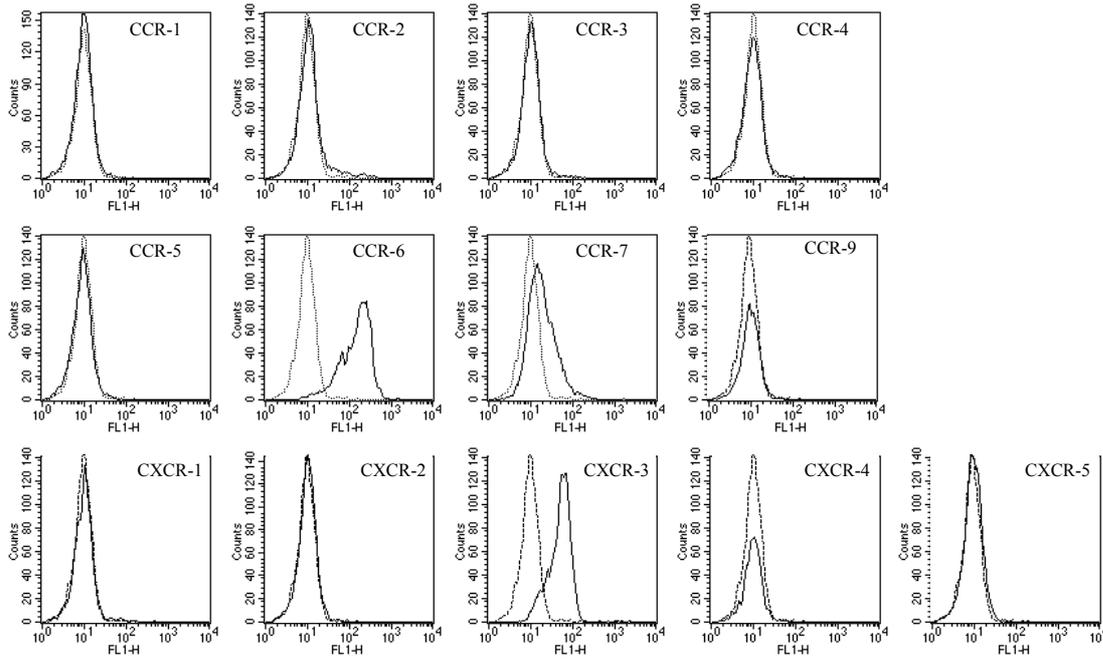


Abb. 2:

Chemokinrezeptorexpression auf frisch isolierten Langerhans-Zellen normaler Haut

In der durchflußzytometrischen Analyse zeigte sich eine einzelne, homogene CD1a-positive Zellpopulation, welche den LC entspricht. Die Expression der Chemokinrezeptoren auf diesen LC (durchgezogene Linien) ist im Vergleich zum Kontrollantikörper (durchbrochene Linien) dargestellt. In dieser repräsentativen Probe zeigten sich CCR-6, schwächer CXCR-3 und CCR-7 exprimiert.

Durch die Isolierung epidermaler Zellen wird ein Ausreifungsvorgang der gut Antigenprozessierenden, jedoch schlecht Antigen präsentierenden unreifen LC hin zu schlecht Antigenprozessierenden, jedoch gut Antigen präsentierenden reifen LC angestoßen. Im Rahmen dieser Ausreifung änderte sich auch das Expressionsmuster der Chemokinrezeptoren. Nach 24stündiger Inkubation der Epidermalzellsuspensionen in Kulturmedium zeigte sich ohne Zusatz von Stimulantien bei allen Proben eine deutliche Abnahme der CCR-6-Expression auf den LC. Statt dessen wurden die Rezeptoren CCR-7, CXCR-1, CXCR-3 und CXCR-4 vermehrt exprimiert. Die übrigen Chemokinrezeptoren waren auch nach Kultur nicht nachweisbar (Abb. 3).

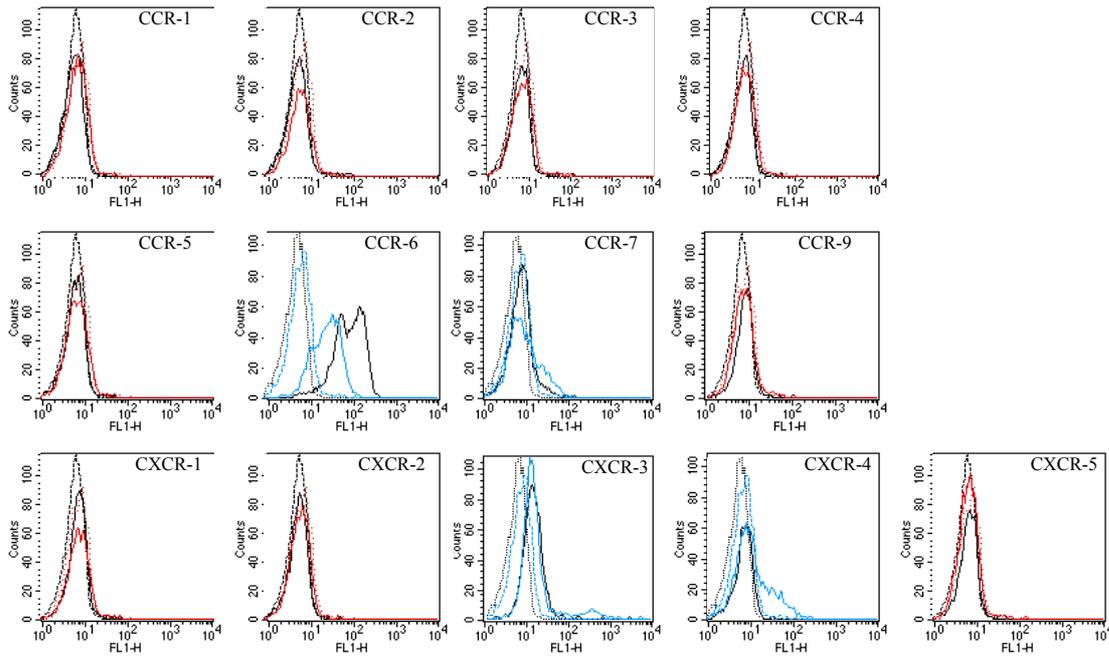


Abb. 3:

Vergleich der Chemokinrezeptorexpression auf frisch isolierten und kultivierten Langerhans-Zellen der normalen Haut

Die Untersuchung der Chemokinrezeptoren auf frisch isolierten LC (schwarz) und für 24 h kultivierten LC (grau) zeigt, daß CCR-6, jeweils im Vergleich zum Kontrollantikörper (unterbrochene Linie) im Verlauf der Ausreifung deutlich herabreguliert wird. Im Gegenzug wird CCR-7 etwas stärker von kultivierten Zellen exprimiert; CXCR-4 wird ausschließlich von kultivierten Zellen exprimiert.

Je Rezeptor wurden mindestens 4, maximal 8 Proben aus normaler, nicht entzündlicher Haut untersucht, wobei die statistische Analyse die Beobachtungen der ersten Experimente mit einer deutlichen Abnahme der Expression des Rezeptors CCR-6 und einer leichten Zunahme von CCR-7 und der vorher nicht exprimierten Rezeptoren CXCR-1 und CXCR-4 bestätigte. In Abbildung 4 sind die relativen Fluoreszenzindizes der Rezeptoren auf LC vor und nach Kultur der aus NH gewonnenen Epidermalzellsuspensionen im Vergleich dargestellt. Die statistische Auswertung mit dem Wilcoxon-Test zeigte für CCR-6, CXCR-1 und CXCR-4 signifikante Expressionsunterschiede vor und nach Kultur.

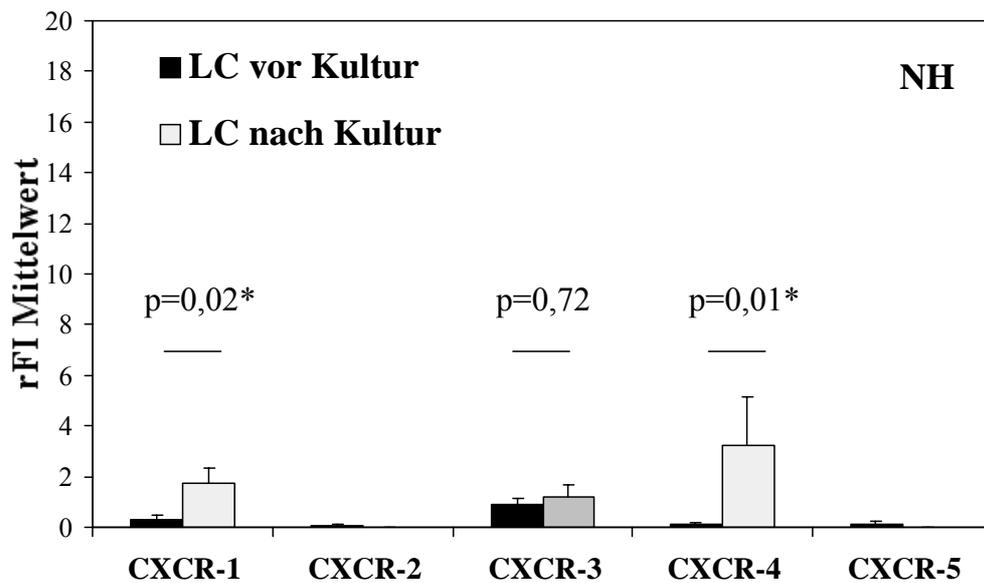
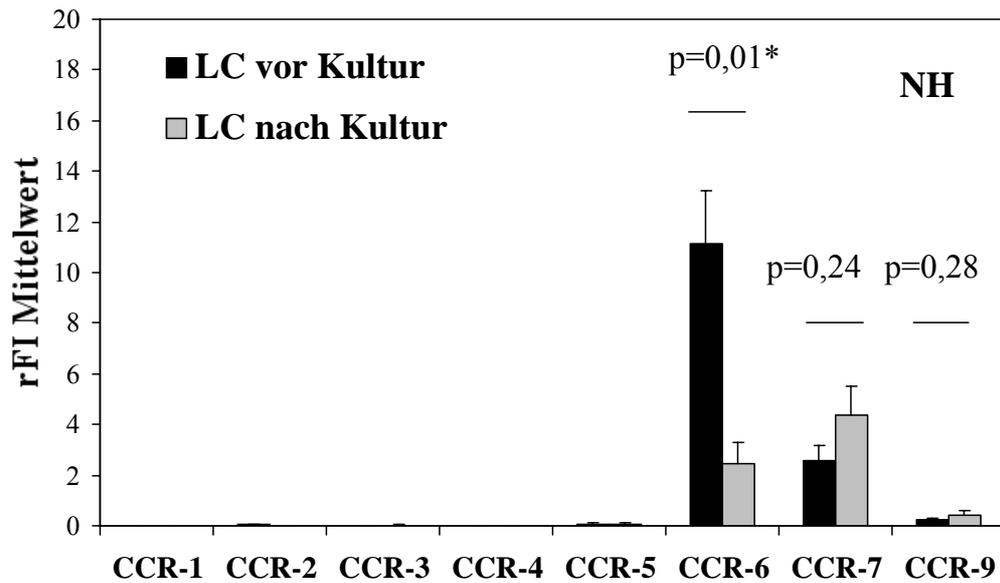


Abb. 4:

Statistische Analyse der Chemokinrezeptorexpression auf frisch isolierten und kultivierten Langerhans-Zellen aus normaler Haut

Vergleich der relativen Fluoreszenzindizes (rFI) sämtlicher untersuchter Chemokinrezeptoren auf LC aus normaler Haut (n=4-8) in standardisierter Immunphänotypisierungstechnik (arithmetischer Mittelwert und Standardfehler). Hier bestätigte sich die Herabregulation von CCR-6, sowie die Aufregulation von CCR-7, CXCR-1 und CXCR-4 (*jeweils signifikant).

3.2 In entzündlich veränderter Haut weisen die Langerhans-Zellen ein verändertes Chemokinrezeptor-Expressionsmuster auf

In entzündlich veränderter Haut sind Langerhans-Zellen ebenso nachweisbar wie in normaler Haut. Zusätzlich findet sich, unabhängig von der Diagnose, meist noch eine zweite dendritische Zellpopulation, die Inflammatorischen dendritischen epidermalen Zellen [42]. In der Durchflußzytometrie entspricht die stärker CD1a-positive der beiden dendritischen Zellpopulationen den LC. Diese LC aus entzündlich veränderter Haut wiesen in den durchflußzytometrischen Untersuchungen ein von LC der normalen Haut unterschiedliches Chemokinrezeptor-Expressionsmuster auf, welches in Abbildung 5 dargestellt ist. CCR-5 und CXCR-3 wurden von LC/EH stärker, CCR-6 wurde schwächer exprimiert. CCR-7 wurde von LC/EH nicht exprimiert (s. auch Abb. 8).

3.3 Die maturationsassoziierten Veränderungen der Chemokinrezeptorexpression auf Langerhans-Zellen sind in normaler Haut und bei atopischem Ekzem gleichartig

Auch frisch isolierte Langerhans-Zellen aus entzündlicher Haut bei atopischem Ekzem veränderten ihren Phänotyp nach 24stündiger Kultur, die wiederum ohne Zusatz von Stimulantien erfolgte. Die Zellen zeigten dabei Veränderungen derjenigen Rezeptoren, welche auch nach Kultur von Langerhans-Zellen in normaler Haut verändert waren, nämlich eine signifikante Herabregulierung von CCR-6 ($p=0,02$) sowie eine signifikante Aufregulierung von CCR-7 ($p=0,02$) und CXCR-4 ($p=0,03$) (Abb. 6, vgl. auch Abb. 3) sowie eine verstärkte, jedoch nicht signifikante Expression von CXCR-1.

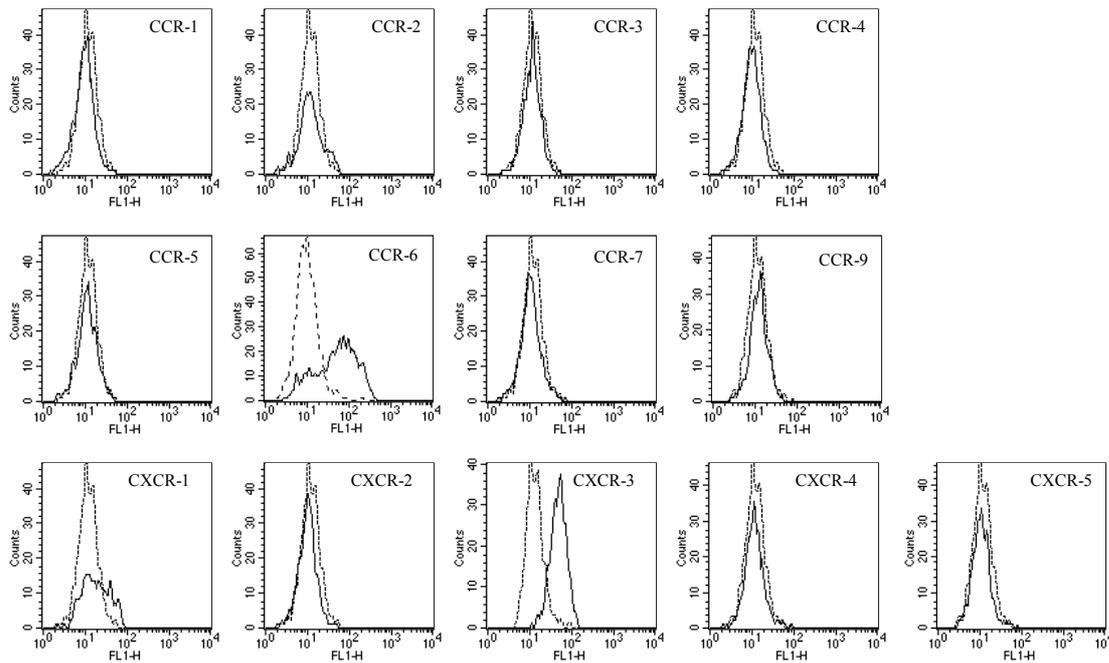


Abb. 5:
Chemokinrezeptorexpression auf frisch isolierten Langerhans-Zellen bei atopischem Ekzem

In der durchflußzytometrischen Analyse einer repräsentativen Probe entzündlich veränderter Epidermis bei atopischem Ekzem zeigten sich zwei homogene Zellpopulationen. Eine war mittelgradig CD1a-positiv, die andere sehr stark CD1a-positiv. Letztere entspricht den LC und ist in dieser Abbildung dargestellt. LC exprimierten in entzündlicher Haut CCR-6 und CXCR-3. Die restlichen untersuchten Chemokinrezeptoren waren in dieser Probe nicht nachweisbar.

3.4 Inflammatorische dendritische epidermale Zellen weisen ein von Langerhans-Zellen unterschiedliches Chemokinrezeptor-Expressionsmuster auf

Frisch isolierte Inflammatorische dendritische epidermale Zellen aus entzündlichen Hautproben mehrerer unterschiedlicher Dermatosen wurden auf ihre Chemokinrezeptorexpression hin untersucht. Diese Zellen stellten sich stets als die schwächer CD1a und stärker CD11b ausprägende der beiden in entzündlich veränderter Haut vorhandenen dendritischen Zellpopulationen dar. Auf ihrer Oberfläche fanden sich bei allen untersuchten Hautproben CCR-2, CCR-5, CCR-6, CCR-7, CXCR-1, CXCR-3 und CXCR-4 deutlich exprimiert. In Abbildung 7 ist die durchflußzytometrisch untersuchte Expression der Chemokinrezeptoren auf IDEC in einer repräsentativen Probe aus entzündlich veränderter Haut bei atopischem Ekzem dargestellt.

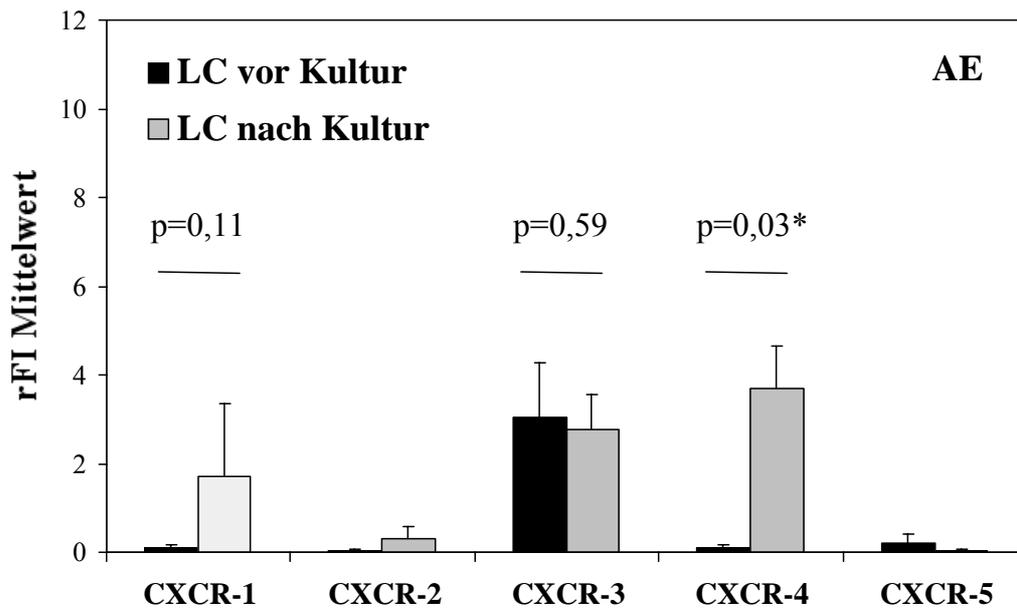
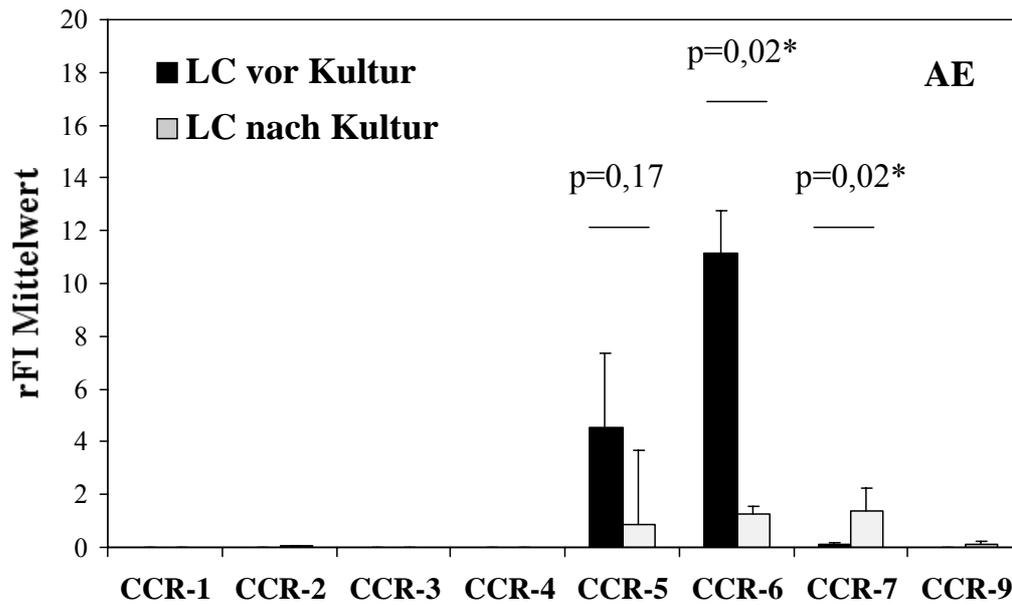


Abb. 6:

Chemokinrezeptorexpression auf frisch isolierten Langerhans-Zellen bei atopischem Ekzem im Vergleich vor und nach 24stündiger Kultur

Die relativen Fluoreszenzindizes auf LC vor und nach 24stündiger Kultur bei je drei unterschiedlichen Proben bei atopischem Ekzem sind dargestellt. CCR-6 wurde signifikant herabreguliert. CCR-7 und CXCR-4 haben signifikant an Expressionsstärke zugenommen (*), während CXCR-1 nicht signifikant aufreguliert wurde.

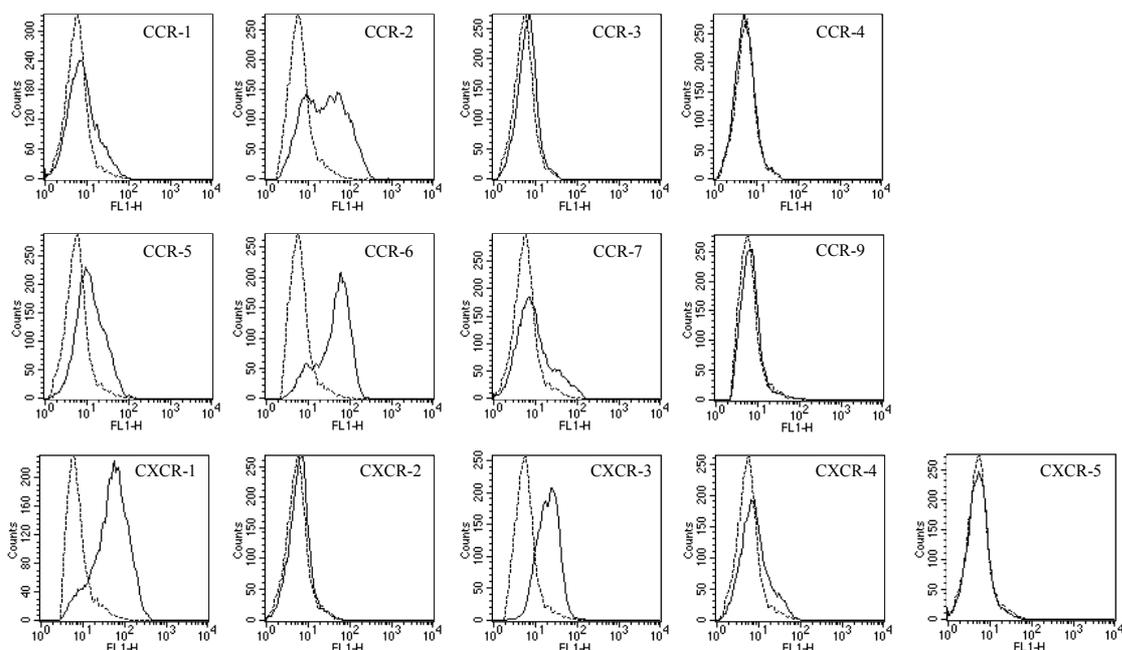


Abb. 7:
Chemokinrezeptorexpression auf frisch isolierten Inflammatorischen dendritischen epidermalen Zellen bei atopischem Ekzem

In der durchflußzytometrischen Analyse von dendritischen Zellen aus entzündlich veränderter Epidermis bei atopischem Ekzem zeigten sich bei einer repräsentativen Probe auf den IDEC CCR-2, CCR-5, CCR-6, CXCR-1 sowie CXCR-3 deutlich exprimiert. CCR-7 war nur sehr gering ausgeprägt.

In der APAAP-Färbung war in läSIONALER Haut bei atopischem Ekzem epidermal und auch dermal ein dichtes Infiltrat CD1a-positiver, dendritisch geformter Zellen zu sehen. CD11b war in der Dermis auf vielen solcher Zellen angefärbt, epidermal waren etwas weniger CD11b-positive Zellen zu finden. Hier fanden sich epidermal zahlreiche dendritisch geformte Zellen, die CXCR-3 trugen, viele, die CCR-5 exprimierten sowie vereinzelt dendritisch geformte Zellen, die mit CCR-9, CXCR-1, CXCR-2 und CXCR-4 angefärbt waren. In der Dermis waren viele solcher Zellen positiv für CCR-5, CXCR-1 und CXCR-3, wenige der dendritisch geformten Zellen waren mit CCR-3, CCR-9 und CXCR-4 angefärbt. Die restlichen untersuchten Chemokinrezeptoren waren in den Schnitten nicht angefärbt. Die beiden DC-Populationen ließen sich also in der APAAP-Färbung in läSIONALER Haut bei atopischem Ekzem gut darstellen, interessanterweise trugen sie jedoch weder CCR-2, noch CCR-6 oder CCR-7, welche in der durchflußzytometrischen Untersuchung auf DC exprimiert waren. Umgekehrt zeigte sich in der APAAP-Färbung bei atopischem Ekzem eine deutliche Expression des Rezeptors CXCR-2 auf dendritisch geformten Zellen, der in den FACS-Analysen lediglich auf IDEC in ganz geringem Ausmaß exprimiert war.

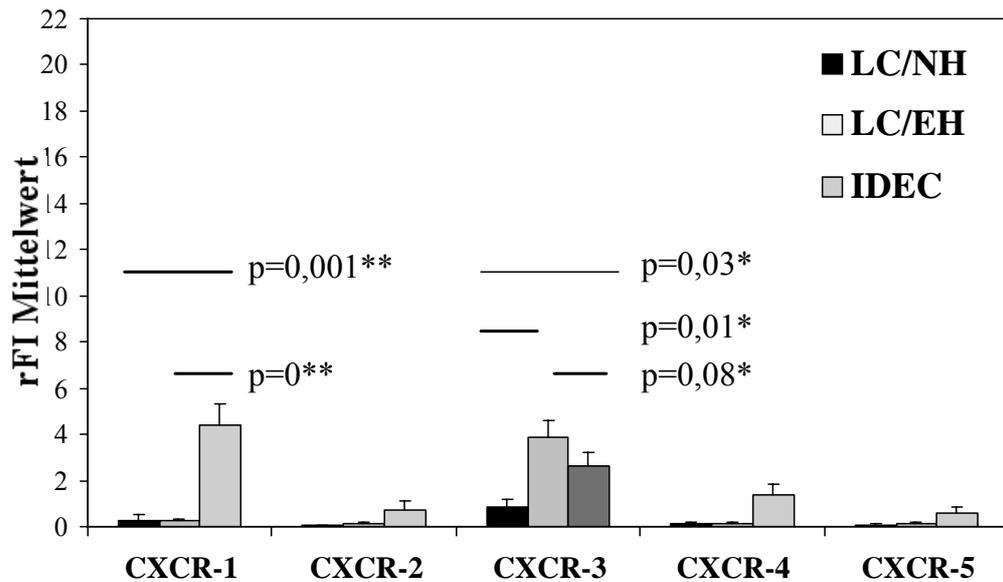
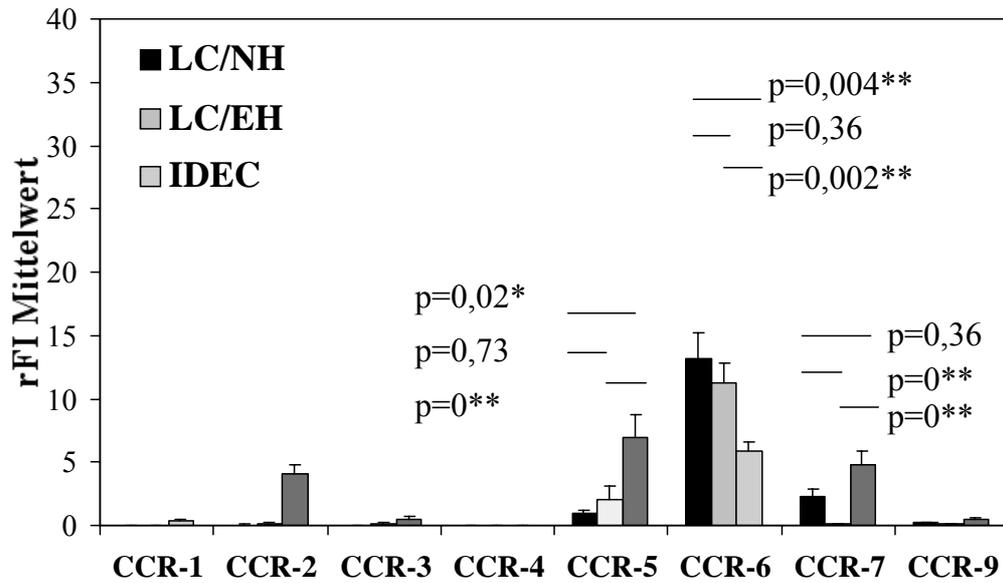


Abb. 8:

Vergleich der Chemokinrezeptorausprägung auf dendritischen Zellen in normaler und in entzündlich veränderter Haut

LC/EH zeigten bis auf CCR-7 und CXCR-3 ein ähnliches Rezeptormuster wie LC/NH (LC/NH n=4-11, LC/EH n=10-18, IDEC n=13-22). Auf IDEC waren CCR-5, CCR-7 und CXCR-1 stärker ausgeprägt als auf LC/EH (**hochsignifikant). CCR-2, CXCR-2 und CXCR-4 zeigten sich lediglich auf IDEC. CCR-6 hingegen war auf IDEC geringer ausgeprägt als auf LC/EH (**hochsignifikant).

3.5 Inflammatorische dendritische epidermale Zellen regulieren in der Kurzzeitkultur ihre CXCR-4-Expression signifikant herauf, während CCR-5 und CCR-6 signifikant herabreguliert werden

Epidermale Einzelzellsuspensionen wurden aus entzündlich veränderter Haut bei atopischem Ekzem isoliert (n=3) und für 24 Stunden ohne Zusatz von Stimulantien in Kultur genommen. Dabei fand eine deutliche Veränderung der Chemokinrezeptorexpression auf IDEC statt. Die Rezeptoren CCR-5 und CCR-6 wurden signifikant herabreguliert (p jeweils 0,02). Eine Abnahme der Expressionsstärke war bei CCR-7, CCR-9, CXCR-1 sowie CXCR-3 zu beobachten, diese erwies sich jedoch jeweils als nicht signifikant. Der Rezeptor CXCR-4 wurde nach 24stündiger Kultur signifikant stärker exprimiert (p=0,03) (Abb. 9).

3.6 Diagnoseabhängigkeit des Chemokinrezeptor-Expressionsusters auf dendritischen Zellen in entzündlich veränderter Haut

Proben der Hauterkrankungen atopisches Ekzem (n=6-11) und Psoriasis (n=3-6) wurden miteinander verglichen. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Chemokinrezeptorexpression auf Langerhans-Zellen (Abb. 10).

Im Gegensatz dazu waren auf IDEC diagnoseabhängige Unterschiede vorhanden. Beim atopischen Ekzem war auf IDEC CXCR-3 signifikant stärker exprimiert als bei der Psoriasis (p=0,02). CXCR-1 und CXCR-4 waren ebenfalls deutlich stärker exprimiert, die Unterschiede erwiesen sich jedoch als nicht signifikant. Hingegen waren CCR-5 und CCR-6 nur diskret stärker ausgeprägt als bei der Psoriasis, wobei die Unterschiede wiederum nicht signifikant waren. IDEC zeigten beim atopischen Ekzem etwas geringere Expressionen von CCR-2 und CCR-7 (Abb. 11).

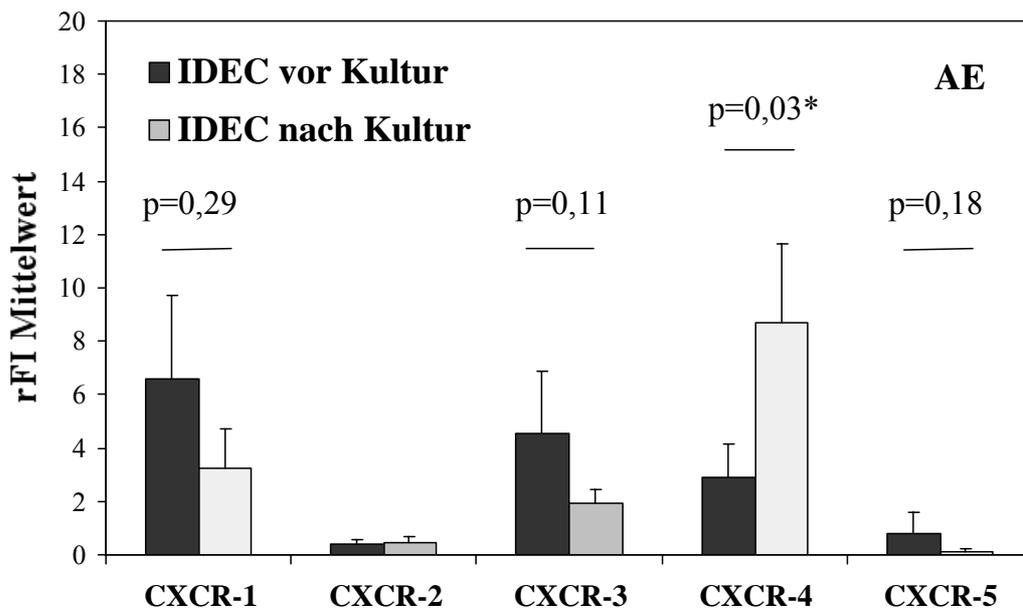
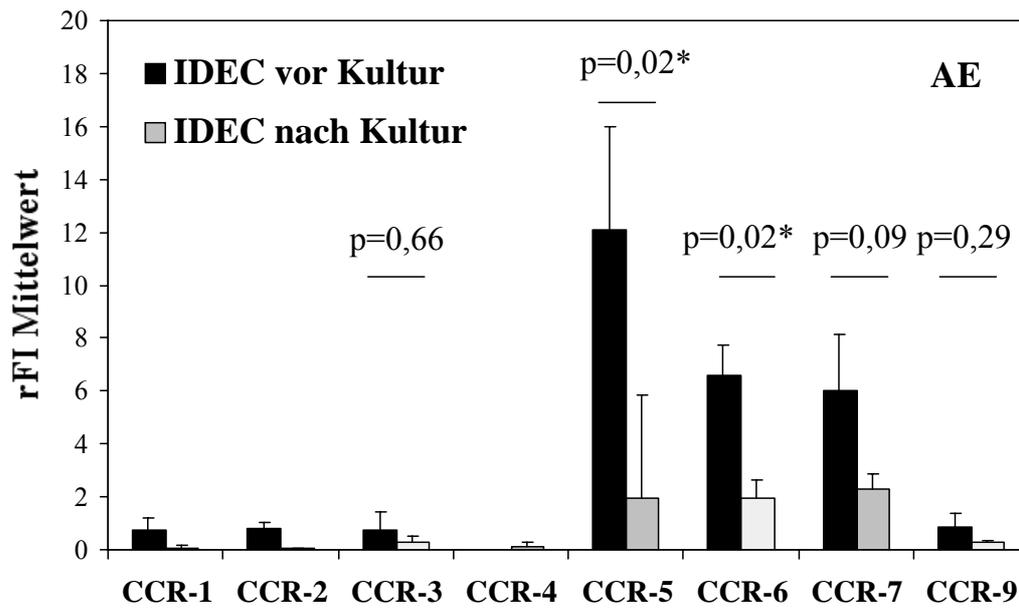


Abb. 9:

Chemokinrezeptorexpression auf Inflammatorischen dendritischen epidermalen Zellen bei atopischem Ekzem im Vergleich vor und nach 24 Stunden Kultur

Nach 24stündiger Kultur der Einzelsuspensionen aus entzündlich veränderter Haut bei atopischem Ekzem (n=3-7) war auf IDEC eine Herabregulierung von CCR-5 und CCR-6 (*) sowie von CCR-3, CCR-7, CCR-9, CXCR-1, CXCR-3 und CXCR-5 zu sehen. Lediglich CXCR-4 wurde signifikant aufreguliert.

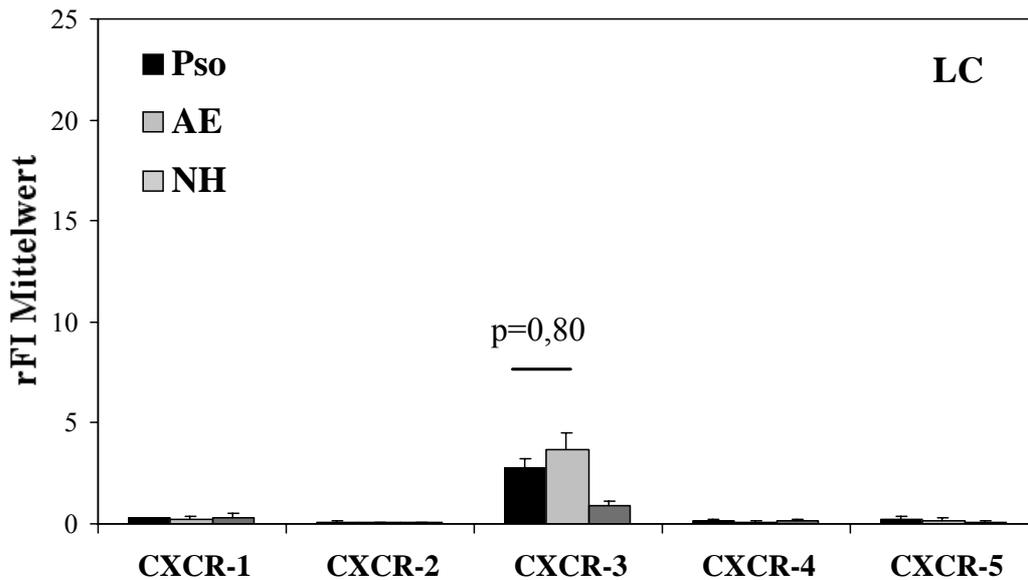
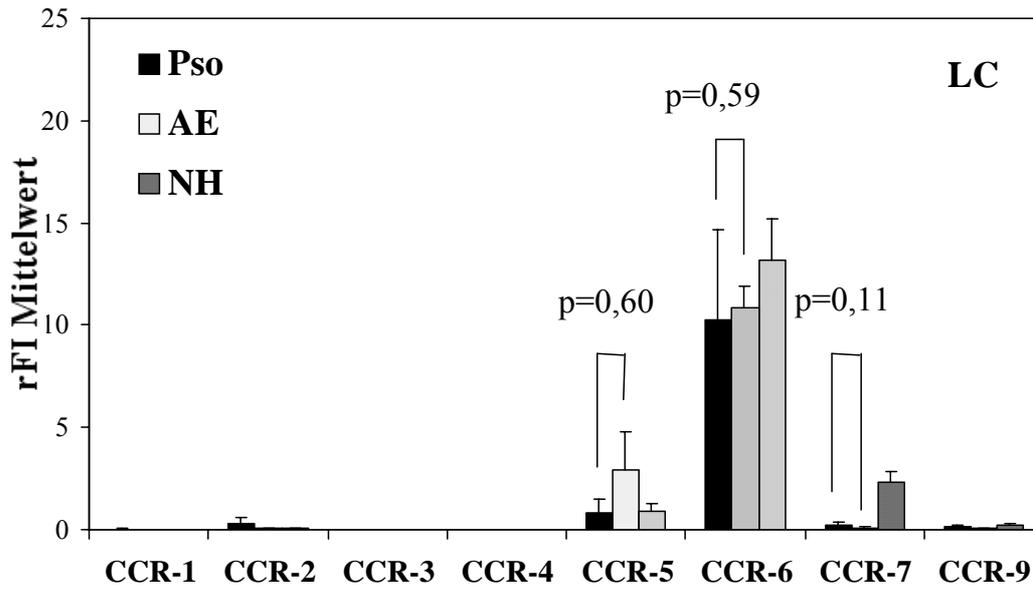


Abb. 10:

Vergleich der Chemokinrezeptorexpression auf Langerhans-Zellen bei Psoriasis, atopischem Ekzem und normaler Haut

Die Hauterkrankungen Psoriasis (n=3-6) und AE (n=6-11) wurden hinsichtlich der Chemokinrezeptorexpression auf LC miteinander verglichen. Daneben noch einmal NH (n=4-11). Ein deutlicher Unterschied zeigte sich bei CCR-7 und CXCR-3 zwischen NH und EH, wie bereits in 3.2 beschrieben. Die Ausprägung dieser drei Rezeptoren auf LC war jedoch bei AE und Psoriasis in ähnlicher Stärke vorhanden, geringgradige Unterschiede erwiesen sich als nicht signifikant.

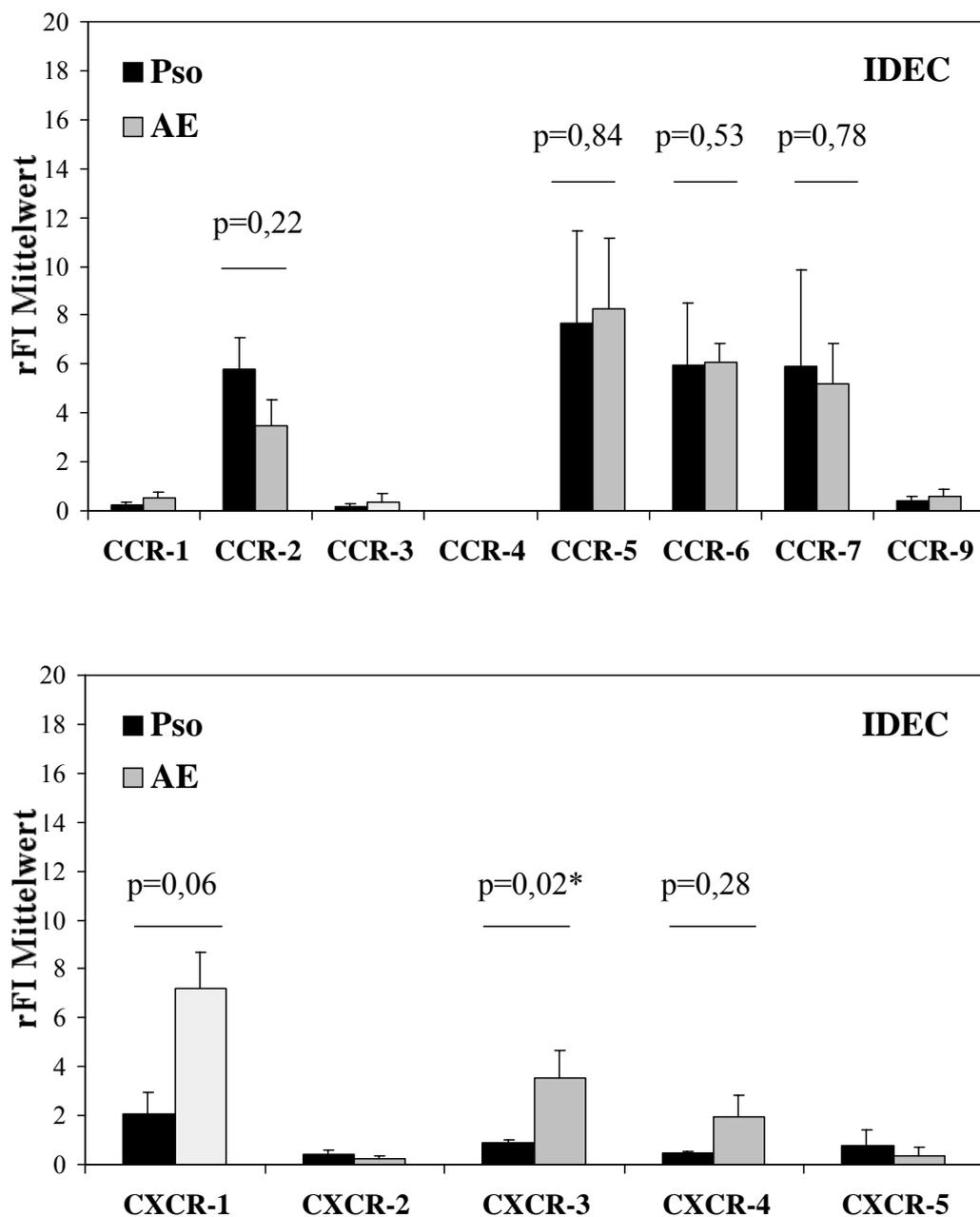


Abb. 11:

Vergleich der Chemokinrezeptorexpression auf Inflammatorischen dendritischen epidermalen Zellen bei Psoriasis und atopischem Ekzem

Diagnoseabhängige Unterschiede zeigten sich beim Vergleich der Chemokinrezeptorexpression auf IDEC bei Psoriasis (n=3-6) und AE (n=6-11) einerseits in der Expression von CCR-2 und CCR-7, die bei Psoriasis stärker exprimiert waren. Andererseits waren beim atopischen Ekzem CCR-5, CCR-6, CXCR-1, CXCR-3 und CXCR-4 stärker exprimiert. Lediglich die stärkere Expression von CXCR-3 auf IDEC beim atopischen Ekzem war signifikant.

3.7 Monozyten und MoDC als Modelle kutaner dendritischer Zellen und ihrer Vorläufer

3.7.1 MoDC exprimieren lediglich CCR-5, Monozyten exprimieren am stärksten CCR-2, CXCR-2 und CXCR-4

Frisch isolierte Monozyten wurden als Modell für die Untersuchung der Chemokinrezeptorexpression auf Vorläufern dendritischer Zellen im peripheren Blut herangezogen (n=3-9). Auf ihnen waren CCR-2, CXCR-2 und CXCR-4 deutlich exprimiert, schwächer CCR-1, CCR-3, CCR-4, CCR-5 und CXCR-3 (Abb. 12).

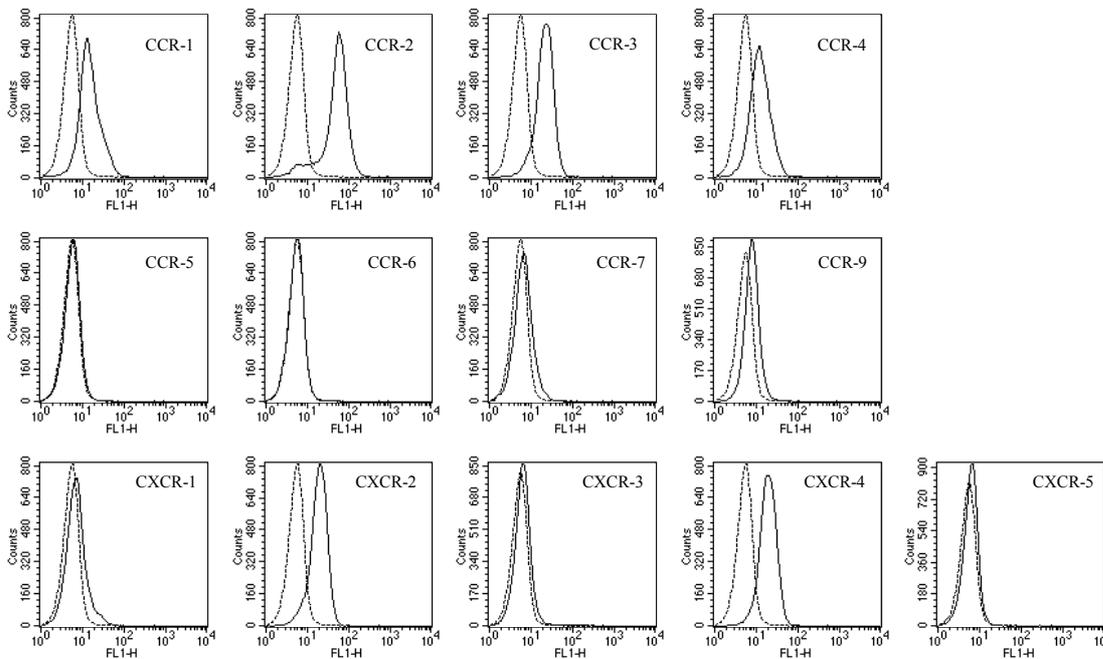


Abb. 12:

Chemokinrezeptorexpression auf frisch isolierten Monozyten des peripheren Blutes

In dieser repräsentativen Probe frisch isolierter Monozyten waren CCR-1, CCR-2, CCR-3, CCR-4, CXCR-2 und CXCR-4 deutlich exprimiert.

Ebenso wurden in-vitro aus Monozyten generierte dendritische Zellen, MoDC, als Modell für die Untersuchung der Chemokinrezeptorexpression auf Vorläufern dendritischer Zellen im peripheren Blut untersucht. Hier zeigte sich bei den untersuchten MoDC (n=4-8) lediglich CCR-5, jeweils in unterschiedlicher Stärke, exprimiert. In Abbildung 13 ist die Expression der

untersuchten Chemokinrezeptoren auf MoDC aus Monozyten einer Blutprobe dargestellt, bei der sich zusätzlich die nur manchmal exprimierten Rezeptoren CCR-1 und CXCR-1 nachweisen ließen.

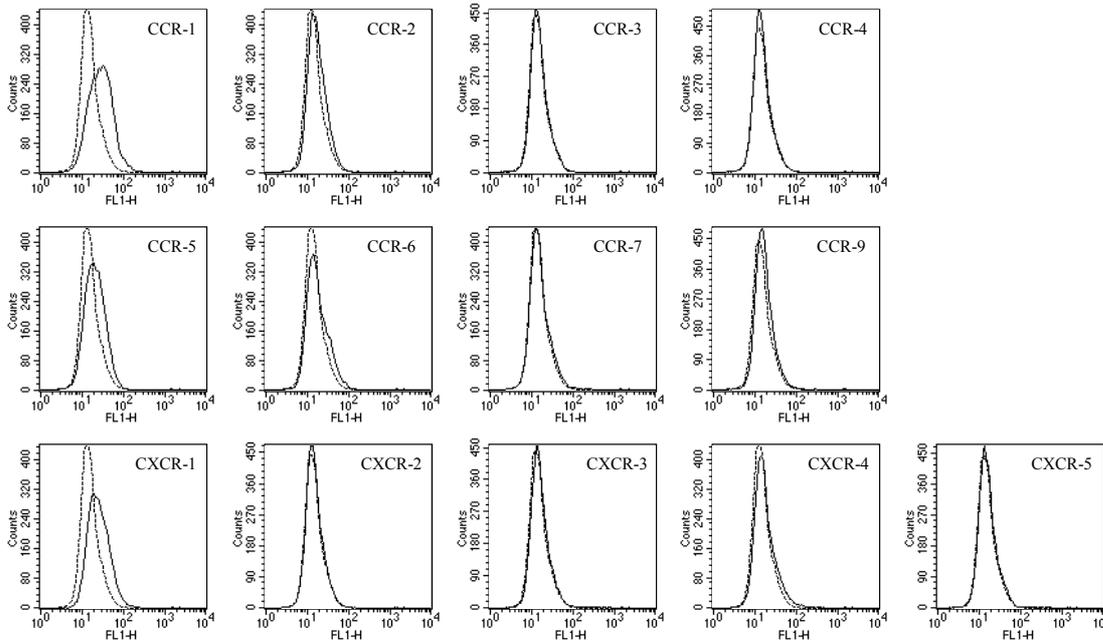


Abb. 13:

Chemokinrezeptorexpression auf Monocyte-derived dendritic cells (MoDC)

Die durchflußzytometrischen Untersuchung dieser einzelnen Probe ergab eine ganz diskrete Expression von CCR-1, CCR-5 und CXCR-1.

Die monozytäre Zelllinie U937 wurde als ein weiteres Modell einer Vorläuferpopulation dendritischer Zellen untersucht. Auf dieser Zellart waren alle Chemokinrezeptoren mehr oder minder stark exprimiert. Die höchsten Expressionen waren für CCR-3, CCR-5, CXCR-2 und CXCR-4 nachzuweisen (s. Abb. 14).

MoDC, die ein dendritisches Ausreifungsstadium der Monozyten darstellen, hatten CCR-2, CXCR-2 und CXCR-4 verloren, exprimierten jedoch CCR-5 stärker als Monozyten. U937 ähnelten hinsichtlich ihrer CCR-5-, CCR-6- und CCR-7-Expression eher den MoDC als frisch isolierten Monozyten (Abb. 15).

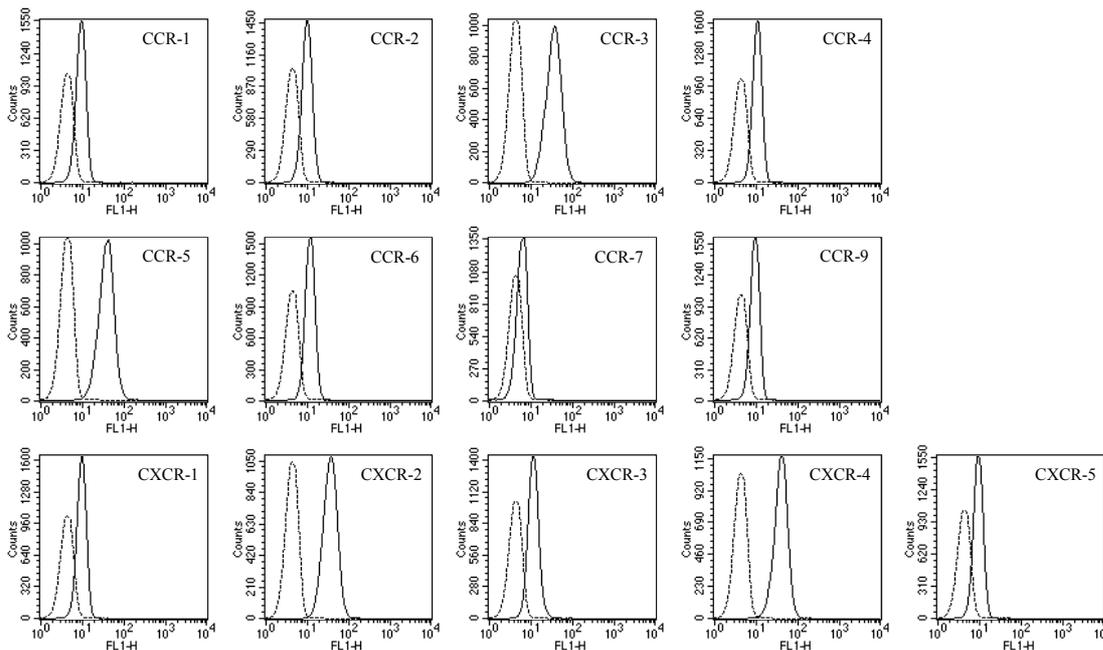


Abb. 14:
Chemokinrezeptorexpression auf U937-Zellen

Die monozytäre Zelllinie U937 exprimierte alle überprüften Chemokinrezeptoren, am stärksten waren jedoch CCR-5, CCR-6, CXCR-2 und CXCR-4 nachweisbar

3.7.2 Alle untersuchten Zelltypen weisen eigenständige Charakteristika hinsichtlich der Chemokinrezeptorexpression auf

Beim Vergleich von Monozyten, MoDC und dendritischen Zellen aus normaler und entzündlich veränderter Haut zeigten sich gleichartige Chemokinrezeptor-Expressionsmuster lediglich bei Monozyten und IDEC. Dies betraf alle untersuchten Rezeptoren außer CCR-4, der nur auf Monozyten vorhanden war, sowie CCR-6, CCR-7 und CXCR-1, die auf IDEC, nicht aber auf Monozyten exprimiert waren. Der für die Einwanderung von sogenannten non-LC DC in die Epidermis wichtige Rezeptor CCR-5 [7] war auf Monozyten, MoDC und IDEC gleichermaßen exprimiert. CCR-6 und CCR-7, funktionell bedeutsam für die Migration dendritischer epidermaler Zellen nach Antigenkontakt in Richtung der Lymphorgane [12] [46], waren lediglich auf epidermalen dendritischen Zellen, nicht aber auf ihren Vorläufern zu finden. Die übrigen Zellarten wiesen völlig unterschiedliche Chemokinrezeptor-Expressionsmuster auf (Abb. 16).

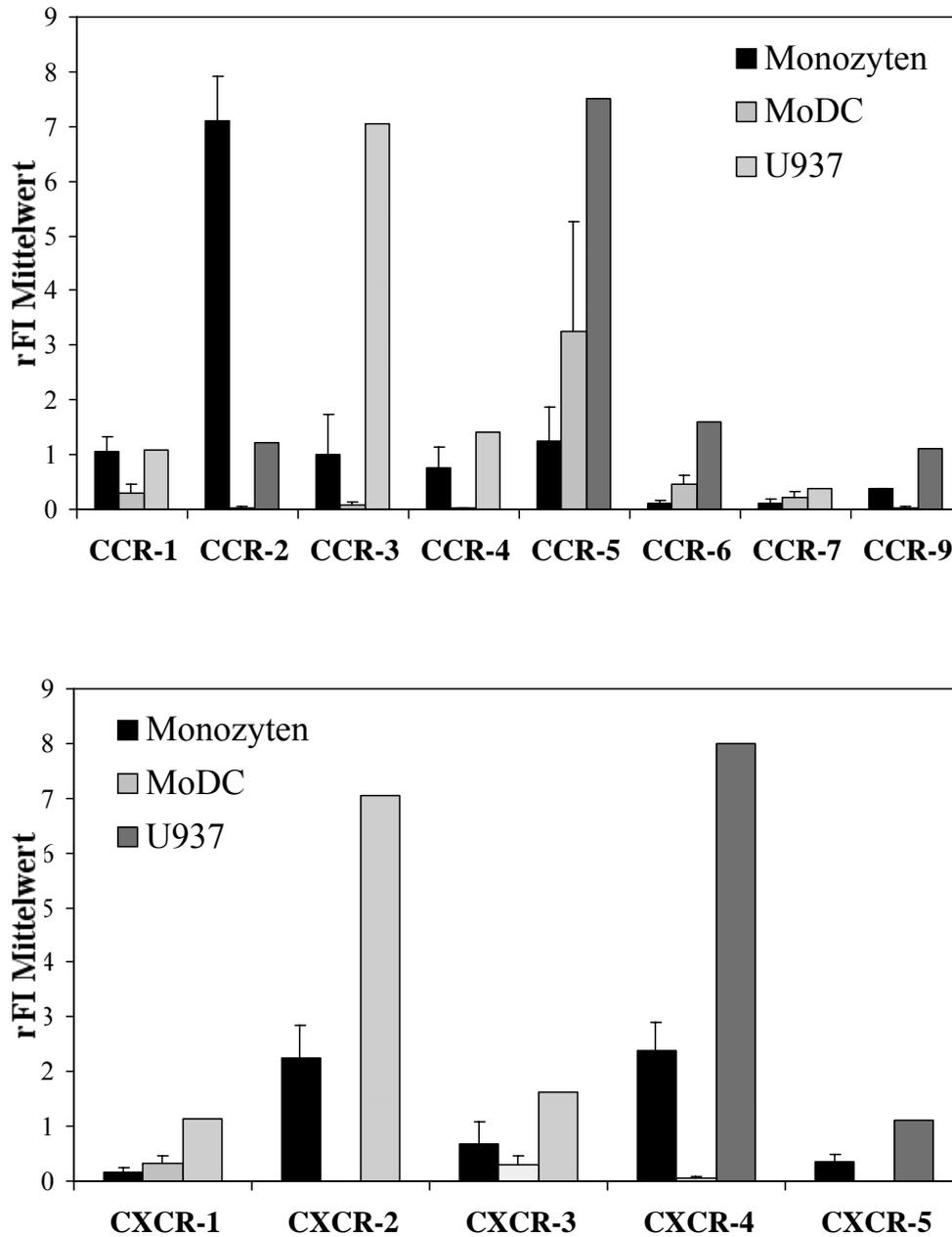


Abb. 15:

Vergleich der Chemokinrezeptorexpression auf Monozyten, MoDC und U937-Zellen

MoDC exprimierten am deutlichsten CCR-5 und von den anderen Rezeptoren nur einige diskret. Monozyten prägten stark CCR-2 aus, etwas weniger deutlich CXCR-2 und CXCR-4 und von allen anderen Rezeptoren jeweils sehr wenig. U937-Zellen exprimierten von den untersuchten Rezeptoren CCR-7 am wenigsten und die übrigen Chemokinrezeptoren unterschiedlich stark, am meisten jedoch CCR-3, CCR-5, CXCR-2, CXCR-4.

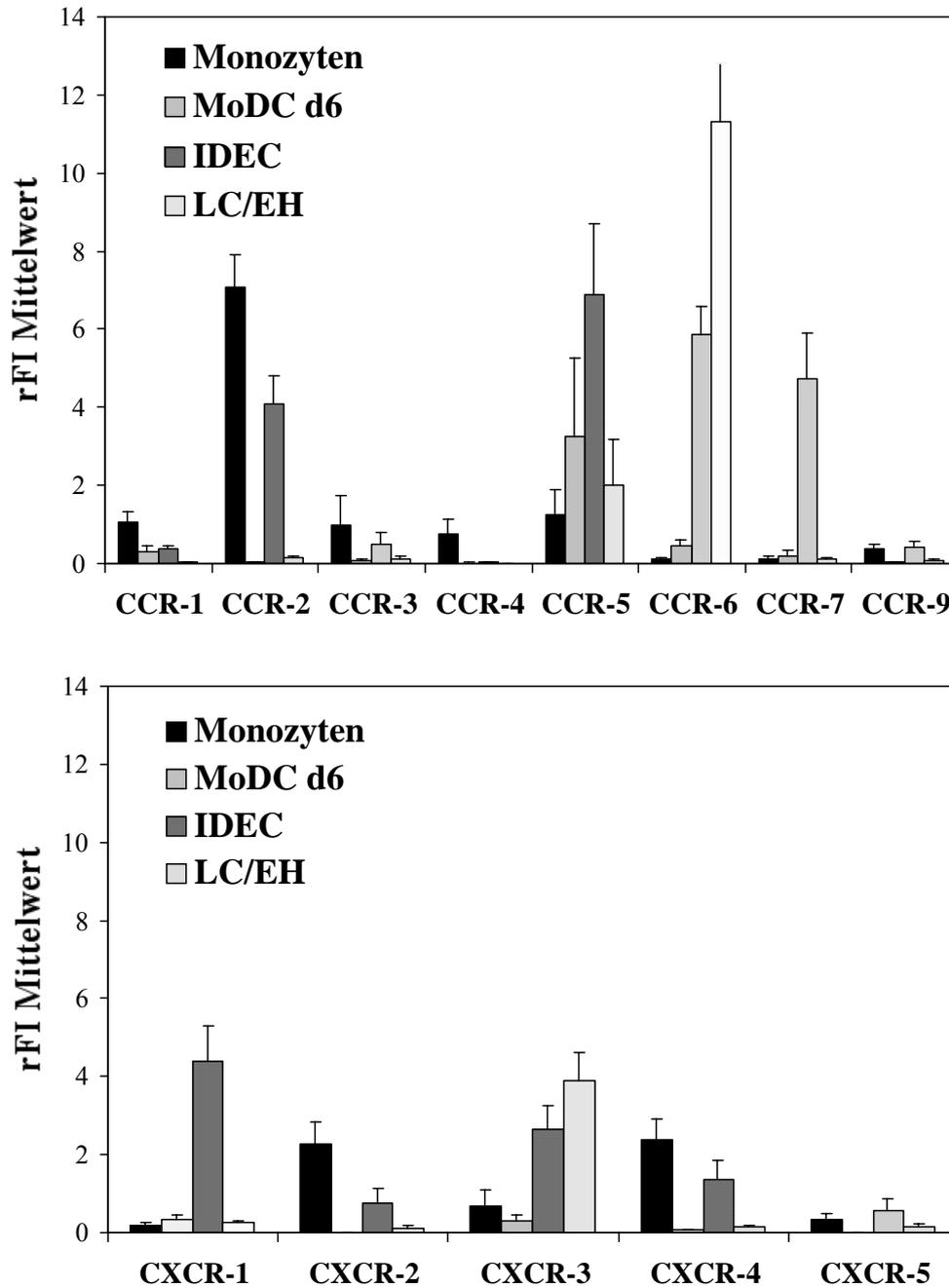


Abb. 16:

Vergleichende Darstellung der Chemokinrezeptorexpression bei Monozyten, MoDC, IDEC und LC/EH

Von den untersuchten Zellarten ähnelten sich Monozyten und IDEC hinsichtlich ihres Chemokinrezeptor-Expressionsmusters am meisten. MoDC und IDEC hatten lediglich eine deutliche CCR-5-Expression gemein. Die übrigen dargestellten Zellarten zeigten völlig unterschiedliche Chemokinrezeptor-Expressionsmuster.

3.8 Mit TNF- α oder LPS inkubierte MoDC regulieren CCR-5 herab und behalten die sehr geringe Expression von CCR-6 und CCR-7 bei

MoDC stellen ein Modell für unreife DC dar. Nach weiteren zwei Tagen in Kultur mit Stimulantien wie TNF- α oder LPS gelten die so entstandenen Zellen als Modell für reife DC [31] [27] [4]. Untersucht wurde in vier Versuchen die Ausprägung von CCR-5 sowie in je drei Versuchen die Ausprägung der Rezeptoren CCR-6 und CCR-7 nach Stimulation der MoDC mit TNF- α oder LPS. CCR-5 wird eine Rolle bei der Einwanderung dendritischer Zellvorläufer aus der Blutbahn in die Epidermis zugeschrieben [7]. CCR-6 und CCR-7 sind funktionell für die Wanderung dendritischer Zellen nach Antigenkontakt in Richtung der Lymphorgane bedeutsam.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt. Nach 48stündiger Stimulation mit TNF- α fand sich bei CCR-5 eine deutliche Abnahme der Expressionsstärke; nach Stimulation mit LPS war diese Abnahme noch ausgeprägter. Im Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben waren diese Unterschiede zwar nicht signifikant, dies dürfte aber darauf zurückzuführen sein, dass lediglich vier Proben zur Auswertung kamen ($p=0,07$).

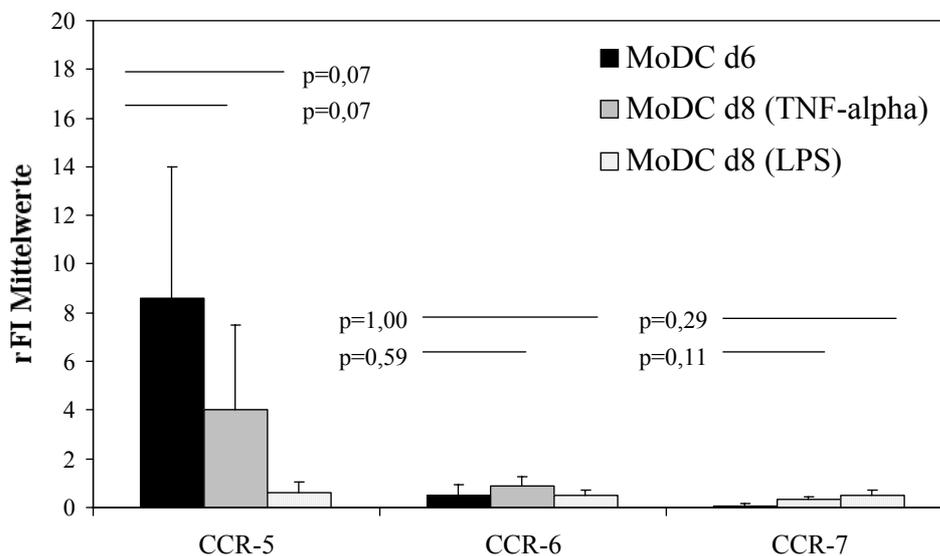


Abb. 17:
Vergleich von MoDC mit stimulierten MoDC

Im Rahmen der Ausreifung immaturer MoDC kommt es zu einer deutlichen Herabregulation des für die Einwanderung dendritischer Zellen in die Haut funktionell bedeutsamen CCR-5 ($n=4$), wobei LPS stärkere Effekte zeigt als das Zytokin TNF- α . CCR-6 und CCR-7 (je $n=3$) zeigen sich vor Kulturnahme mit den beiden Stimulantien nur sehr gering exprimiert und nach Kultur mit LPS oder TNF- α kaum verändert.

4. Diskussion

4.1 Die durch Isolation induzierte Reifung epidermaler Langerhans-Zellen beinhaltet auch Veränderungen der Chemokinrezeptor-Expression

Eine 24stündige Kulturnahme frisch aus normaler Haut hergestellter Epidermalzell-suspensionen induziert bekanntermaßen eine Änderung des Phänotyps der LC im Sinne einer Reifung [28]. Während einer Reifung der LC wird CCR-6 herabreguliert und CCR-7 wird aufreguliert [11] [29] [46].

Nach Kulturnahme ergab sich in den durchflußzytometrischen Analysen dieser Arbeit vor allem eine signifikante Herabregulierung von CCR-6, eine signifikante Aufregulierung von CXCR-1 und CXCR-4, jedoch nur eine diskrete, nicht signifikante Aufregulierung von CCR-7 und CXCR-3. Die Rezeptoren CCR-1, -2, -3, -4, -5, CXCR-2 und CXCR-5 wurden auf LC/NH weder vor noch nach Kultur exprimiert.

Die fehlende Signifikanz bei der Aufregulierung von CCR-7 auf LC beim Vergleich vor und nach Kultur könnte darauf begründet sein, dass dieser Rezeptor unerwarteterweise bereits auf frisch isolierten LC/NH exprimiert war. Möglicherweise stammten einige Proben aus nicht gänzlich entzündungsfreier Haut. Eine weitere Erklärung wäre, dass bereits durch die Manipulation bei der Herstellung der Einzelzellsuspensionen - beispielsweise der Kontakt der Zellen mit der Kunststoffoberfläche einer Petrischale - eine Reifung der LC/NH angestoßen wurde und zu einer bereits geringgradigen Expression von CCR-7 führten. Dazu würde auch passen, dass dieser Rezeptor in der zur Kontrolle herangezogenen APAAP-Färbung wie erwartet auf LC/NH nicht nachweisbar war.

Für die nach Kultur deutlich, jedoch nicht in signifikanter Weise veränderte Expression von CCR-7, CCR-9 und CXCR-3 auf Langerhans-Zellen in normaler Haut ist denkbar, dass die fehlende Signifikanz auf die geringen untersuchten Fallzahlen zurückzuführen ist, und dass sich bei der Untersuchung größerer Fallzahlen signifikante Unterschiede ergeben könnten. Zudem besteht die Möglichkeit, dass eine Veränderung nach Kultur deshalb geringfügiger ausgeprägt ist als erwartet, weil wiederum durch eine isolationsbedingte Reifung der LC bereits bei der Analyse der frisch isolierten Zellen gleichsinnig veränderte Expressionsstärken vorlagen. Dass sich das Chemokinrezeptorprofil in sehr kurzer Zeit verändern kann, ist bereits von Sallusto beschrieben worden [33]. Ihr zufolge werde die Herabregulierung von CCR-6 allerdings zu rapide vollzogen, um sie durch eine verminderte Transkription zu erklären. Sie hält einen anderen Mechanismus für die schnellen Änderungen im Expressionsmuster für

denkbar: Reifende DC beginnen, selbst dasjenige Chemokin zu produzieren und zu sezernieren, durch das gerade eben noch ihre Reifung angestoßen wurde. Konsekutiv würde der Rezeptor auf ihrer Oberfläche durch Bindung dieses Chemokins maskiert.

4.2 Die in der Literatur beschriebenen Expressionsunterschiede zwischen normaler und entzündlich veränderter Epidermis bei CCR-6 und CCR-7 auf epidermalen dendritischen Zellen könnten durch das Hinzutreten der IDEC erklärt werden

Die in der Literatur vertretene Annahme ist, dass nach Antigenkontakt eine Herabregulierung von CCR-6 sowie eine Aufregulierung von CCR-7 auf LC stattfinden [11] [29] [46]. In den zugrundeliegenden Untersuchungen ist jedoch lediglich die gesamte CD1a-positive Zellpopulation betrachtet und als LC bezeichnet worden. Dass sich diese aus den beiden Subpopulationen LC und IDEC zusammensetzt, wurde bislang nicht berücksichtigt [42].

Den Angaben in der Literatur zufolge ist der Rezeptor CCR-6 auf dendritischen Zellen in entzündlicher Haut herabreguliert [11] [29] [46]. In den durchflußzytometrischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit exprimierten jedoch in entzündlicher Haut befindliche LC diesen Rezeptor in ähnlich hohem Ausmaß wie LC/NH. IDEC hingegen zeigten durchflußzytometrisch eine schwächere Expression von CCR-6. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass der in der Literatur beschriebenen verminderten Expression von CCR-6 nach Reifung eine Herabregulierung dieses Rezeptors bei den IDEC, nicht hingegen bei den LC, zugrundeliegt. Durch die separate Analyse von LC und IDEC konnte in der vorliegenden Arbeit zudem die Beobachtung gemacht werden, dass CCR-7 nicht auf LC/EH vorhanden ist, wohl aber auf IDEC. Diese beiden Beobachtungen sprechen dafür, dass IDEC, die erst während der Entwicklung der entzündlichen Gewebereaktion als zweite Population hinzutreten, die für die insgesamt stärkere Expression von CCR-7 und die insgesamt schwächere Expression von CCR-6 auf der Gesamtpopulation dendritischer Zellen in entzündlicher Haut ausschlaggebenden Zellen darstellen.

Die Unterschiede zwischen LC/EH und IDEC deuten auf unterschiedliche Aufgaben der beiden Zellpopulationen im Ablauf der kutanen Entzündungsreaktion hin. Wie das Zusammenspiel der verschiedenen Zellarten im einzelnen abläuft, ist vor allem aufgrund der Vielzahl der nicht rezeptorspezifischen Liganden derzeit noch weitgehend unklar.

4.3 Die Trypsinempfindlichkeit des CXCR-2 bedingt falsch negative Untersuchungsergebnisse in der durchflußzytometrischen Analyse

Der Rezeptor CXCR-2 ist in der Literatur bisher nicht auf LC beschrieben worden. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit war CXCR-2 auf Schnitten und in durchflußzytometrischen Analysen normaler Haut ebenfalls nicht auf epidermalen LC nachweisbar. In entzündlicher Epidermis des atopischen Ekzems fand sich immunhistochemisch jedoch eine deutliche Expression von CXCR-2 auf dendritisch gefomten Zellen. Dieser Rezeptor war in den durchflußzytometrischen Analysen nur ganz diskret auf IDEC und nicht auf LC exprimiert.

Man könnte vermuten, dass CXCR-2 möglicherweise aufgrund einer Empfindlichkeit gegenüber Trypsin während der Herstellung der Einzelzellsuspension verändert wurde und deshalb nur schwach im FACS, aber deutlich in der APAAP-Färbung auf DC in entzündlicher Epidermis detektiert werden konnte. Dies bestätigte sich nach Inkubation der CXCR-2 exprimierenden Kontrollzellen U937 mit Trypsin, da der mittlere Fluoreszenzindex vor und nach Inkubation eine Reduktion zeigte.

Da sich CXCR-2 lediglich auf DC in EH und nicht in NH zeigte, ist es möglich, dass es sich bei den in der APAAP-Färbung CXCR-2-positiven DC tatsächlich um IDEC handelt. Andererseits können Chemokinrezeptoren internalisiert werden, was bedeutet, dass sie zeitweise nicht an der Zelloberfläche vorhanden sind. Auch dies ist ein möglicher Erklärungsansatz für die äußerst geringe Expression von CXCR-2 auf DC in den durchflußzytometrischen Untersuchungen, zumal Zellen aufgrund der erforderlichen Inkubationen lange Zeit niedrigen Temperaturen ausgesetzt sind, wodurch eine Internalisierung bedingt sein könnte.

4.4 Die signifikant höhere Expression von CXCR-3 auf IDEC bei atopischem Ekzem ist möglicherweise von funktioneller Bedeutung für die Pathogenese der Erkrankung und ihrer Komplikationen

Bereits in früheren immundermatologischen, durchflußzytometrischen Untersuchungen stellten sich auf IDEC von LC unterschiedliche, diagnoseabhängige Expressionsmuster einiger Oberflächenmoleküle dar, deren Bestimmung zur Differenzierung zwischen atopischem Ekzem und Psoriasis vulgaris angewandt werden könnte. So ist beim atopischen

Ekzem eine starke Aufregulierung der FcεRI-Expression auf IDEC zu finden, bei der Psoriasis vulgaris sind IgG-Rezeptoren stärker auf IDEC exprimiert [44] [41].

In den durchflußzytometrischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit verhielt sich die Chemokinrezeptorexpression der LC/EH bei allen entzündlich veränderten Hautproben ähnlich. So waren auch zwischen AE und Psoriasis vulgaris keine signifikanten Unterschiede auf LC/EH zu erkennen. Die beiden Dermatosen unterschieden sich hingegen signifikant in der Expression des Rezeptors CXCR-3 auf IDEC, der bei AE auf diesen Zellen signifikant stärker ausgeprägt war ($p=0,03$).

Die Liganden für CXCR-3 sind das Interferon inducible protein-10 (IP-10) und Monokine induced by gamma-Interferon (MIG). Beide binden lediglich an CXCR-3 und werden durch IFN- γ induziert, während IFN- γ die Expression der meisten übrigen Chemokine unterdrückt. CXCR-3 könnte daher bei viralen Infektionen oder bei Typ-IV-Reaktionen eine Rolle spielen, die durch IFN- γ vermittelt werden [2]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass bei manchen Patienten mit atopischem Ekzem durch eine Epikutantestung mit Aeroallergenen Ekzempläsionen induziert werden können [16]. Hier wäre eine IFN- γ - und CXCR-3-vermittelte Beteiligung der IDEC bei der Antigenpräsentation denkbar. Eine höhere Inzidenz viraler Sekundärinfektionen beim atopischen Ekzem, so zum Beispiel die Komplikation eines Eczema herpeticatum oder Eczema molluscatum, mag ebenso mit einer Interaktion von vermehrt exprimiertem CXCR-3 mit den beiden durch IFN- γ induzierten Chemokinen zusammenhängen.

4.5 IDEC stellen eine eigenständige Zellpopulation dar, die nicht durch Reifung aus den LC hervorgehen, sondern aus der Blutbahn in die Epidermis einwandern

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Immunphänotyp der IDEC mit dem der MoDC hinsichtlich der Expression zahlreicher Oberflächenmoleküle große Ähnlichkeit aufweist (CD11a, CD11b, CD11c, CD80, CD86, CLA, CD1b, CD36) [22]. Viele dieser Oberflächenmoleküle können essentiell zur Einwanderung von Zellen in die Epidermis beitragen.

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit unterschieden sich jedoch IDEC und MoDC hinsichtlich der Chemokinrezeptorexpression insgesamt sehr stark. Lediglich CCR-5 war auf beiden Zelltypen vorhanden. Da dieser Rezeptor eine wichtige Rolle bei der Einwanderung dendritischer Zellen in die Epidermis zu spielen scheint [7], spricht dies wiederum dafür, dass

IDEC aus der Blutbahn einwandern. Die sehr unterschiedliche Expression der übrigen untersuchten Chemokinrezeptoren auf MoDC und IDEC ist womöglich dadurch bedingt, dass IDEC zunächst die Dermis durchwandern mussten, bevor sie in die entzündlich veränderte Epidermis eingebettet wurden, und dass der Kontakt mit unterschiedlichen Zellen während dieser Durchwanderung der Dermis zur Veränderung des Immunphänotyps der IDEC führt.

IDEC exprimierten dagegen sieben Rezeptoren, die auch von Monozyten exprimiert wurden. Dies spräche für die Vermutung, dass IDEC durch die Chemokin-Rezeptor-Interaktion aus dem peripheren Blut in die Epidermis und rasch an den Ort der Entzündung gelotst werden.

MoDC wurden für 48 Stunden entweder mit LPS oder mit TNF- α zur Reifung stimuliert. Es zeigte sich bei drei Versuchen eine deutliche, allerdings wahrscheinlich aufgrund der sehr geringen Fallzahl nicht signifikante Herabregulation des Rezeptors CCR-5 nach Stimulation mit LPS sowie eine etwas schwächere Herabregulation nach Stimulation mit TNF- α . Eine Herabregulation von CCR-5 auf MoDC nach Stimulation mit Monocyte conditioned medium, TNF- α , LPS oder IL1- β ist bereits in der Literatur beschrieben worden [9] [20], ebenso auf Monozyten nach Stimulation mit LPS oder TNF- α [35] [36]. Der Rezeptor war in den durchflußzytometrischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit auf LC/NH und LC/EH nicht vorhanden, auch nach Kultur nicht, wohl aber auf frisch isolierten IDEC, was auch durch die deutliche immunhistochemische Anfärbung bei AE im Gegensatz zu NH bestätigt wurde. Zudem war nach 24stündiger Kultur der Einzelzellsuspensionen aus entzündlich veränderter Epidermis ohne Stimulation mit einem der oben genannten Faktoren bereits eine leichte Herabregulation von CCR-5 und eine deutliche Aufregulation von CXCR-4 auf IDEC zu erkennen, wie dies bereits bei MoDC nachgewiesen werden konnte [9] [20]. Interessanterweise ist bei der Generierung von MoDC aus Monozyten eine Aufregulierung von CCR-5 sowie ein Verlust des CXCR-4 zu bemerken, also eine Veränderung der Expressionsstärke, die in umgekehrter Weise nach weiterer Reifung der MoDC stattfindet. Da sich IDEC nach Kultur hinsichtlich der CCR-5- und CXCR-4-Expression ähnlich verhalten wie unreife MoDC, ist ein indirekter Hinweis darauf gegeben, dass IDEC aus der Blutbahn in die entzündlich veränderte Epidermis eingewandert sind, dort in noch unreifer Form vorliegen und noch das Potenzial zur Reifung besitzen. Delgado vertritt die Ansicht, dass die Herabregulierung von β -CKR wie CCR-5 während der Reifung dazu beiträgt, dass DC nicht weiter wandern, nachdem T-Zellen in den Lymphorganen oder an Orten der Spättyreaktion aufgefunden wurden [9].

Die Bedeutung der Aufregulierung von CXCR-4 auf reifenden DC ist nicht klar, zumal sein Ligand SDF-1 sowohl in lymphatischen als auch in nicht-lymphatischen Geweben produziert

wird. Allerdings tragen auch naive T-Zellen diesen Rezeptor. Dies könnte dafür sprechen, dass beide Zellarten durch die an CXCR-4 bindenden Liganden an einen Ort des Geschehens gelockt werden sollen, wo sie zusammen wirken können [33].

5. Zusammenfassung

Dendritische Zellen sind aufgrund ihrer Fähigkeit zur Antigenpräsentation für die Entstehung von entzündlichen Hauterkrankungen wesentlich. Dabei enthält normale Haut eine homogene, stark CD1a exprimierende, Birbeck-Granula positive Population von Langerhans-Zellen. In entzündlich veränderter Haut ist zusätzlich eine gering CD1a, dafür stark CD11b exprimierende Population Inflammatorischer dendritischer epidermaler Zellen (IDEC) nachweisbar. Der Phänotyp dendritischer Zellen verändert sich im Laufe eines durch Antigenkontakt angestoßenen Reifungsprozesses. Chemokinrezeptoren sind an ein G-Protein gekoppelte Oberflächenrezeptoren mit sieben transmembranen Domänen.

Bislang wurde die Expression von Chemokinrezeptoren auf humanen dendritischen Zellen hauptsächlich auf mRNA-Ebene oder durchflußzytometrisch analysiert: In frisch isolierten epidermalen LC wird mRNA für die Chemokinrezeptoren CCR-2, CCR-6, CCR-7 und CXCR-4 transkribiert. Monozyten und aus Monozyten generierte dendritische Zellen (MoDC), welche unreifen dendritischen Zellen entsprechen, besitzen mRNA für CCR-1, -2, -3, -5 sowie CXCR-1, -2 und -4. Durch geeignete Stimulation ausgereifte MoDC besitzen mRNA für CCR-3, CCR-7 und CXCR-4. Mittels Durchflußzytometrie wurden auf MoDC CCR-5, CXCR-1 und CXCR-2 nachgewiesen, wobei nach der Ausreifung der MoDC CCR-6 herabreguliert und CCR-7 heraufreguliert werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Expression der Chemokinrezeptoren auf frisch isolierten sowie kultivierten epidermalen dendritischen Zellen durchflußzytometrisch untersucht werden, die aus normaler und entzündlich veränderter Haut insbesondere des atopischen Ekzem isoliert wurden. Zum Vergleich sollten Monozyten sowie unreife und ausgereifte MoDC in gleicher Technik untersucht werden.

Die durchflußzytometrischen Untersuchungen zeigten, dass sich das Chemokinrezeptor-Expressionsmuster der aus normaler Haut isolierten Langerhans-Zellen im Rahmen der isolationsbedingten Ausreifung ändert. Dies bestätigte Vorarbeiten anderer Arbeitsgruppen.

In entzündlich veränderter Haut konnte durch Anwendung der durchflußzytometrischen Technik erstmals eine Untergliederung und klare Zuordnung der Expressionsmuster zu Langerhans-Zellen und IDEC erfolgen, welche sich insbesondere bei CCR-5, CCR-6 und CXCR-1 in ihrem Chemokinrezeptor-Expressionsmuster unterschieden. Im Vergleich zeigten die IDEC ein den Monozyten am nächsten kommendes Chemokinrezeptor-Expressionsmuster. Im Rahmen der isolationsbedingten Ausreifung von IDEC änderte sich das Chemokinrezeptor-Expressionsmuster ebenso wie das der Langerhans-Zellen. So nahm

die Expression von CCR-6 bei Langerhans-Zellen aus normaler wie entzündlicher Haut nach Kulturnahme signifikant ab, wohingegen CCR-7 auf beiden Zellarten deutlich, jedoch nur bei Langerhans-Zellen aus entzündlich veränderter Haut in signifikantem Ausmaß aufreguliert wurde. Nach Kulturnahme von IDEC wurden CCR-5 und CCR-6 signifikant herabreguliert und CXCR-4 signifikant aufreguliert.

Der für die Einwanderung dendritischer Zellen in die Epidermis bedeutsame Rezeptor CCR-5 war auf Monozyten, MoDC und IDEC gleichermaßen exprimiert. Die für eine Migration epidermaler dendritischer Zellen in Richtung der Lymphorgane wichtigen Rezeptoren CCR-6 und CCR-7 waren bei epidermalen dendritischen Zellen, nicht hingegen bei ihren Vorläuferzellen exprimiert. MoDC regulierten nach 48stündiger Inkubation mit TNF- α oder LPS CCR-5 herab und behielten die vor Inkubation bestehende geringe Expression von CCR-6 und CCR-7 bei.

Beim Vergleich von Proben läsionaler Haut aus atopischem Ekzem mit solchen aus Psoriasis zeigten sich hinsichtlich der LC keine signifikanten diagnoseabhängigen Unterschiede in der Chemokinrezeptor-Expression, hinsichtlich der IDEC war eine beim atopischen Ekzem signifikant stärkere Expression des CXCR-3 zu vermerken.

Die Ergebnisse dieser Arbeit, in der - im Gegensatz zu bisher publizierten Untersuchungen - eine Unterscheidung zwischen LC und IDEC vorgenommen wurde, sprechen dafür, dass CCR-7-exprimierende IDEC in entzündlicher Epidermis neu hinzutreten und für die bisher in der Literatur beschriebene Expressionszunahme von CCR-7 auf DC in entzündlicher Haut verantwortlich sind. Auch scheint die verminderte Expression von CCR-6 nach Reifung von DC darauf zu beruhen, dass IDEC neu hinzutreten, da diese CCR-6 nicht exprimierten. Die Expression von CCR-5 auf IDEC korrespondiert gut zur Fähigkeit, aus dem Blut in die Epidermis einzuwandern zu können. Die Ergebnisse stützen somit insgesamt die Hypothese, dass IDEC sich nicht aus LC in der Epidermis entwickeln, sondern aus der Blutbahn in die Epidermis als Ort der Entzündung gelockt werden.

Durch funktionelle Untersuchungen wäre zu klären, in wie weit die beobachteten Unterschiede zwischen Langerhans-Zellen und IDEC die wahrscheinlich unterschiedlichen Aufgaben der beiden Zellpopulationen im Ablauf der kutanen Entzündungsreaktion erklären. Hierzu könnte die Migration dendritischer Zellen auf Chemokingradienten einzelner Chemokine sowie auf Gemische mehrerer Chemokine unter Blockade der Substanzen durch Antikörper untersucht werden.

6. Literatur

1. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA (1996) CC CKR5: a RANTES, MIP-1 alpha, MIP-1 beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 270: 1811-1815
2. Baggiolini M (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392: 565-568
3. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18: 767-811
4. Bender A, Sapp M, Schuler G, Steinman RM, Bhardwaj N (1996) Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J Immunol Methods* 196: 121
5. Bieber T (1997) Fc epsilon RI-expressing antigen-presenting cells: new players in the atopic game. *Immunol Today* 18: 311-313
6. Birbeck MS, Breathnach AS, Everall JD (1961) An electron microscopic study of basal melanocyte and high level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo. *J Invest Dermatol* 37: 51-63
7. Charbonnier AS, Kohrgruber N, Kriehuber E, Stingl G, Rot A, Maurer D (1999) Macrophage inflammatory protein 3alpha is involved in the constitutive trafficking of epidermal langerhans cells. *J Exp Med* 190: 1755-1768
8. Clapham PR (1998) HIV and chemokines ligands sharing cell-surface receptors. *Trends Cell Biol* 7: 264-268
9. Delgado E, Finkel V, Baggiolini M, Mackay CR, Steinman RM, Granelli-Piperno A (1998) Mature dendritic cells respond to SDF-1, but not to several beta-chemokines. *Immunobiol* 198: 490-500
10. Devalaraja MN, Richmond A (1999) Multiple chemotactic factors: fine control or redundancy? *Trends Pharmacol Sci* 20: 151-156

11. Dieu M, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon J, Oldham E, Ait-Yahia S, Briere F, Zlotnik A, Lebecque S, Caux C (1998) Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 188: 373-386
12. Greaves DR, Wang W, Dairaghi DJ, Dieu MC, de Saint-Vis B, Franz-Bacon K, Rossi D, Caux C, McClanahan T, Gordon S, Zlotnik A, Schall TJ (1997) CCR6, a CC chemokine receptor that interacts with macrophage inflammatory protein 3alpha and is highly expressed in human dendritic cells. *J Exp Med* 186: 837-844
13. Horuk R (1999) Chemokine receptors and HIV-1: the fusion of two major research fields. *Immunol Today* 20: 89-94
14. Horuk R, Chitnis CE, Darbonne WC, Colby TJ, Rybicki A, Hadley TJ, Miller LH (1993) A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. *Science* 261: 1182-1184
15. Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Nomiyama H, Schall TJ, Yoshie O (1997) Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 91: 521-530
16. Kerschenlohr K, Decard S, Darsow U, Ollert M, Wollenberg A (2003) Clinical and immunologic reactivity to aeroallergens in 'intrinsic' atopic dermatitis patients. *J Allergy Clin Immunol* 111: 195-197
17. Kim CH, Kunkel EJ, Boisvert J, Johnston B, Campbell JJ, Genovese MC, Greenberg HB, Butcher EC (2001) Bonzo/CXCR6 expression defines type 1-polarized T-cell subsets with extralymphoid tissue homing potential. *J Clin Invest* 107: 595-601
18. Kiriyaama 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
19. Langerhans P (1868) Über die Nerven der menschlichen Haut. *Arch Pathol Anatom* 44: 325-337

20. Lin CL, Suri RM, Rahdon RA, Austyn JM, Roake JA (1998) Dendritic cell chemotaxis and transendothelial migration are induced by distinct chemokines and are regulated on maturation. *Eur J Immunol* 28: 4114-4122
21. Matloubian M, David A, Engel S, Ryan JE, Cyster CJ (2000) A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nat Immunol* 1: 298-304
22. Moderer M (2002) Experimentelle Untersuchungen zur zellbiologischen Charakterisierung inflammatorischer dendritischer epidermaler Zellen in entzündlich veränderter Epidermis. *Dissertationsschrift, München.*
23. Mommaas M, Mulder A, Vermeer BJ, Koning F (1994) Functional human epidermal Langerhans cells that lack Birbeck granules. *J Invest Dermatol* 103: 807-810
24. Moriuchi H, Moriuchi M, Arthos J, Hoxie J, Fauci AS (1997) Promonocytic U937 subclones expressing CD4 and CXCR4 are resistant to infection with and cell-to-cell fusion by T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 71: 9664-9671
25. Proudfoot AEI (1998) The chemokine family. Potential targets from allergy to HIV infection. *Eur J Dermatol* 8: 147-157
26. Rollins BJ (1997) Chemokines. *Blood* 90: 909-928
27. Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G (1994) Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 180: 83-93
28. 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
29. Saeki H, Moore AM, Brown MJ, Hwang ST (1999) Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J Immunol* 162: 2472-2475

30. 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
31. 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
32. Sallusto F, Lanzavecchia A (2000) Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev* 177: 134-140
33. Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Scharniel C, Lenig D, Mackay CR, Qin S, Lanzavecchia A (1998) Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 28: 2760-2769
34. Schweickhart VL, Epp A, Raport CJ, Gray PW (2000) CCR11 is a functional receptor for the monocyte chemoattractant protein family of chemokines. *J Biol Chem* 275: 9550-9556
35. Sica A, Sacconi A, Borsatti A, Power CA, Wells TN, Luini W, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A (1997) Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of C-C chemokine receptors in human lymphocytes. *J Exp Med* 285: 969-974
36. Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, Imai T, Yoshie O, Bonecchi R, Mantovani A (1998) Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* 161: 1083-1086
37. Sozzani S, Luini W, Borate A, Polentarutti N, Zhou D, Piemonti L, D'Amico G, Power CA, Wells TNC, Gobbi M, Allavena P, Mantovani A (1997) Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines. *J Immunol* 159: 1993-2000

38. Steinman RM (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9: 271-296
39. 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 Fc epsilon RI. *J Exp Med* 175: 1353-1365
40. 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 New York Weinheim Queensland REXdale Singapore, pp 20-22
41. Wollenberg A, Haberstrok 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
42. 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
43. Wollenberg A, Schuller E (1999) Langerhans Zellen und Immunantwort. In: Plewig G, Wolff H (Hrsg) *Fortschritte der praktischen Dermatologie und Venerologie*. Springer, Berlin, pp 41-48
44. Wollenberg A, Wen S, Bieber T (1995) Langerhans cell phenotyping: A new tool for differential diagnosis of inflammatory skin diseases. *Lancet* 346: 1626-1627
45. Wollenberg A, Wen S, Bieber T (1999) Phenotyping of epidermal dendritic cells: clinical applications of a flow cytometric micromethod. *Cytometry* 37: 147-155
46. Yanagihara S, Komura E, Nagafune J, Watarai H, Yamaguchi Y (1998) EBI 1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *J Immunol* 161: 3096-3102
47. Yoshida T, Imai T, Kakizaki M, Nishimura M, Takagi S, Yoshie O (1998) Identification of single C motif-1/lymphotactin receptor XCR1. *J Biol Chem* 273: 16551-16554

7. Anhang

7.1 Verwendete Reagenzien und ihre Zusammensetzung

Monozyten-Waschmedium

NaCl 0,9 %	500,0	ml
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) 0,5M (Titriplex®, Fa.Merck, Darmstadt, Nr.112029)	1,7	ml
Bovines Serumalbumin (BSA) (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, Nr. A-2153)	5,0	g

pH 7,2-7,4 mit 1 M HCl bzw. NaOH einstellen; steril filtrieren; Aufbewahrung bei 4°C

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Phosphate buffered saline, PBS)

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

pH 7,2-7,4 mit 1 M HCl bzw. NaOH einstellen; autoklavieren; Aufbewahrung bei 4°C

Trypsin-Lösung 0,5 %

Trypsin Typ XI (Fa. Sigma-Aldrich, Nr. T-1005)	5	g
PBS	1000	g

pH zwischen 7,2 und 7,4 einstellen; steril filtrieren; aliquotieren und bei -20°C lagern

Desoxyribonuclease (DNase)-Lösung 0,1 %

DNase I, Typ IV (Fa. Sigma-Aldrich, Nr. D-5025)	1	g
PBS	1000	g

pH zwischen 7,2 und 7,4 einstellen; steril filtrieren; aliquotieren; bei -20°C lagern

Kulturmedium

RPMI 1640 mit 0,532 g/l N-Acetyl-L-alanyl-L-Glutamin und 2,0 g/l NaHCO ₃ (Fa. Biochrom, Berlin, Nr. FG1215)	500	ml
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----	----

in diese Lösung folgende Substanzen durch einen 0,2 µm Spritzen-Filteraufsatz für Flaschen (Acro-Filter 50A, 0,2 µm Porengröße, Fa. Gelman Sciences, Roßdorf, Nr. 4260) steril hinein filtrieren:

Antimykotisch-Antibiotische Lösung (Fa. Life Technologies, Karlsruhe, Nr. 15240-062)	5	ml
Fötale Kälberserum (FKS), 30 Minuten bei 56°C im Wasserbad inaktiviert (Fa. Life Technologies, Nr. 10106-169)	50	ml

Aufbewahrung bei 4°C

Trypanblaulösung 0,25 %

Trypanblau (Merck, Nr. 111732)	25	mg
PBS	10	ml

pH 7,2-7,4 mit 1 M HCl bzw. NaOH einstellen; steril filtrieren; bei 4°C lagern

Lipopolysaccharid (LPS)-Stammlösung; Konzentration 10 mg/ml

LPS (Fa. Sigma-Aldrich, Nr. L-2143)	10	mg
PBS	1	ml

Aufbewahrung in Aliquots bei -20°C

LPS-Arbeitslösung; Konzentration 10 µg/ml

LPS-Stammlösung	0,01	ml
PBS	9,99	ml

dies entspricht einer Verdünnung der LPS-Stammlösung von 1:1000; bei -20°C lagern

PBS mit 0,5 % bovinem Serumalbumin (BSA)

PBS	10	ml
BSA (Fa. Sigma-Aldrich, Nr. A-2153)	50	mg

pH mit 1 M HCl bzw. NaOH auf 7,2-7,4 einstellen; Lösung durch ein Filter mit 0,2 µm Porengröße steril filtrieren; Aufbewahrung bei 4°C

Tumor necrosis factor alpha-Stammlösung (TNF- α)

Lyophilisierter humaner rekombinanter TNF- α (Fa. Sigma-Aldrich, Nr. T6674)	10	μg
PBS mit 0,5 % BSA	1	ml

Aufbewahrung in Aliquots bei -80°C

TNF- α -Arbeitslösung

TNF- α -Stammlösung	25	μl
PBS mit 0,5 % BSA	225	μl

dies entspricht einer Verdünnung der Stammlösung von 1:10. Aufbewahrung bei -80°C

PBS zur Herstellung des Puffers für die Durchflußzytometrie (FACS-Puffer)

NaCl	17,00	g
Na ₂ HPO ₄	2,14	g
NaH ₂ PO ₄	0,78	g
Aqua dest.	ad 2000,00	g

pH 7,2-7,4 mit 1 M HCl bzw. NaOH einstellen; autoklavieren, Aufbewahrung bei 4°C

FACS-Puffer

PBS für FACS-Puffer	500	ml
inaktiviertes FKS	5	ml
10 % Natriumazid-Lösung (NaN ₃) (Fa. Merck, Nr. 106688)	5	ml

pH 7,2-7,4 mit 1 M HCl bzw. NaOH einstellen; Lösung durch ein Filter mit 0,2 μm Porengröße steril filtrieren; Aufbewahrung bei 4°C

Monoklonale, unkonjugierte Isotypkontrollen

(Herstellung der Stammlösungen nach Packungsbeilage)

<i>Bezeichnung des Antikörpers</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Isotyp</i>	<i>Klon</i>
IgG1	Sigma, Deisenhofen	mouse IgG1 Pure	MOPC 21
IgG2a	Beckton Dickinson, San Jose, USA	mouse IgG2a Pure	X39
IgG2b	Sigma	mouse IgG2b purified	MOPC 141

Monoklonale, unkonjugierte Antikörper gegen Chemokinrezeptoren

(Herstellung der Stammlösungen nach Packungsbeilage)

<i>Bezeichnung des Antikörpers</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Isotyp</i>	<i>Klon</i>
CCR-1	R&D Systems, Wiesbaden	mouse IgG2b	53504.111
CCR-2	R&D Systems	mouse IgG2b	48607.121
CCR-3	Leukosite, Cambridge, MA, USA	mouse IgG2a	7B11-17-A-10
CCR-4	Leukosite	mouse IgG1	1G1
CCR-5	Leukosite	mouse IgG1	2D7-13-1-1-14-4
CCR-6	R&D Systems	mouse IgG2b	53103.111
CCR-7	Leukosite	mouse IgG2b	7H12-12-2
CCR-9	Leukosite	mouse IgG2b	3C3-E3-1
CXCR-1	Leukosite	mouse IgG2b	5A12-5
CXCR-2	R&D Systems	mouse IgG2a	48311.211
CXCR-3	R&D Systems	mouse IgG1	49801.111
CXCR-4	R&D Systems	mouse IgG2a	12G5
CXCR-5	R&D Systems	mouse IgG2b	51505.111
CD1a	Immunotech, Marseille, Frankreich	mouse IgG1	BL 6
CD11b	Immunotech	mouse IgG1	BEAR 1

Konjugierte Antikörper

<i>Bezeichnung des Antikörpers</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Isotyp</i>	<i>Klon</i>
FITC-conjugated AffiniPure F(ab ^γ) ₂ Fragment Goat Anti- Mouse IgG, Fcγ fragment specific	Dianova, Hamburg	./.	(Code-Nr. 115- 096-008)
T6-RD1 (T6=CD1a-Antigen, RD1=Phycoerythrin (PE))	Coulter, Krefeld	mouse IgG1	SFCI19Thy1A8

7-Amino-Actinomycin D (7-AAD)-Stammlösung

7-AAD (Fa. Sigma, Nr. A-9400)	1	mg
Dimethylsulfoxid (DMSO), Fa. Merck, Nr. 9678)	1	ml

in Aliquots bei -20°C lagern

Vorgemischte Lösung aus 7-AAD und T6-RD1

7-AAD-Stammlösung	20	µl
T6-RD1	30	µl
PBS mit 0,5 % BSA und 0,1 % NaN ₃	450	µl

Aufbewahrung bei 4°C

Vorgemischte Lösung aus 7-AAD und CD14-PE

7-AAD-Stammlösung	8	µl
CD14-PE	120	µl
PBS mit 0,5 % BSA und 0,1 % NaN ₃	72	µl

Aufbewahrung bei 4°C

Stammlösungen für die Herstellung von Tris-PufferStammlösung 1 (0,5 M):

TRIS-Base (Trizma-Base, Fa. Sigma, Steinheim, Nr.T-1503)	60,55	g
Aqua dest.	ad 600,00	g

pH auf 7,4 einstellen mit 25 % HCl, dann:

Aqua dest.	ad 1000,00	g
------------	------------	---

Stammlösung 2:

NaCl	87,66	g
Aqua dest.	ad 1000,00	g

Diese Stammlösungen sind bei RT über längere Zeit haltbar.

Tris-Puffer

Stammlösung 1	100	ml
Stammlösung 2	100	ml
Aqua dest.	ad 1000	ml

pH auf 7,4 -7,6 einstellen mit 2 M HCl; diese Gebrauchslösung ist nur wenige Wochen bei 4°C haltbar

Rabbit-Anti-Mouse-Sekundärantikörper (RaM)

RPMI 1640 mit 2 % inaktiviertem Humanserum	3800	μl
RaM-Immunglobuline (Fa. DAKO, Glostrup, Dänemark, Nr. Z0259)	200	μl

vor Gebrauch den pH mit 0,1 M HCl einstellen, so dass die Farbe der Lösung rot ist

APAAP-Komplex

APAAP Mouse Monoclonal (Fa. DAKO, Glostrup, Dänemark, Nr. D0651)	50	μl
RPMI 1640	2450	μl

mit 0,1 M HCl vor Gebrauch die Farbe der Lösung von pink auf rot umstellen

Saure Hämalaun-Lösung (Reagenz nach P. Mayer/Romeis)

Hämatoxylin	1,0	g
Natriumjodat	0,2	g
Kalialaun.12 H ₂ O	50,0	g
Chloralhydrat	50,0	g
Citronensäure krist.	1,0	g
Gereinigtes Wasser	1000,0	g

7.2 Danksagung

Ich möchte all denen von Herzen danken, die mir diese Arbeit ermöglicht und zu dieser beigetragen haben. In erster Linie jedoch gilt mein Dank

- Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. G. Plewig, Ärztlicher Direktor des Klinikums der Universität und Vorstand der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie - Innenstadt - der LMU, für die großzügige Gewährung der Möglichkeit, die Arbeit in dieser Klinik anzufertigen
- Herrn PD Dr. med. A. Wollenberg für die Überlassung des Themas, seine unermüdlige Begeisterung für das Fach Dermatologie und die Forschung, für seine stete Unterstützung und all die Ermunterungen
- den Doktoranden und AiP des Labors für Immunbiologie, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen, dabei ganz besonders Frau Dr. E. Schuller, Herrn Dr. T. Oppel, Frau Dr. K. Kerschenlohr und Frau Dr. M. Moderer
- meiner mich jederzeit in vollem Maße unterstützenden Familie
- Frau E. Müller-Sander, die bei labortechnischen Fragen aus langjähriger Erfahrung schöpfen konnte und schließlich
- den Mitarbeiterinnen des Serologischen Labors, Frau Multhaup, Frau Orthgieß und Frau Urban, für ihr bereitwilliges und unkompliziertes Management rund um das Durchflußzytometer sowie für ihren ansteckenden Frohsinn

7.3 Lebenslauf

Personalien:

Name: Sandra Marianne Decard
geb. Günther

Geburtsdatum: 09. August 1974

Geburtsort: München

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

Schulbildung:

1980-1984 Grundschule an der Feldmochinger Straße, München

1984-1993 Willi-Graf-Gymnasium, München

1993 Allgemeine Hochschulreife

Studium:

1994-2001 Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität
München

März 1996 Ärztliche Vorprüfung

März 1997 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

April 2000 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

24. April 2001 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruf:

Mai 2001 bis Oktober 2002 Ärztin im Praktikum im Klinikum der Universität München,
Klinik und Poliklinik für Dermatologie
und Allergologie – Innenstadt

seit November 2002 Assistenzärztin in der
Gemeinschaftspraxis der Hautfachärzte
Dr. M. Adler, Dr. D. Voßmann, Dr. I. Lazos,
Berlin