

**In *situ* Charakterisierung aviärer myeloider Zellen in
Haut, Bursa und Lunge des Haushuhns**

Yvonne Gräf

Aus dem
Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung
der Tierärztlichen Fakultät München
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Univ.-Prof. Dr. M. Stangassinger

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. B. Kaspers

**In *situ* Charakterisierung aviärer myeloider Zellen in
Haut, Bursa und Lunge des Haushuhns**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Yvonne Gräf
aus Aschaffenburg

München 2006

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

Referent: Univ.-Prof. Dr. B. Kaspers

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. S. Reese

Tag der Promotion: 28. Juli 2006

RES IN TANTUM INTELLEGITUR,
IN QUANTUM AMATUR

Eine Sache wird nur soweit erfasst,
als sie geliebt wird

(Bernard von Clairvaux)

| | | |
|-----------|--|----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 2 | LITERATUR..... | 3 |
| 2.1 | Entdeckung der dendritischen Zellen | 3 |
| 2.2 | Differenzierungsstadien der dendritischen Zelle | 4 |
| 2.3 | Isolierung dendritischer Zellen..... | 5 |
| 2.4 | Einteilung der dendritischen Zellen | 6 |
| 2.4.1 | Plasmazytoide dendritische Zellen..... | 6 |
| 2.4.2 | Konventionelle dendritische Zellen | 8 |
| 2.4.2.1 | Konventionelle DCs aus dem Blut..... | 8 |
| 2.4.2.2 | Konventionelle DCs aus dem Gewebe..... | 8 |
| 2.4.3 | Follikuläre dendritische Zellen..... | 9 |
| 2.5 | Funktionen der verschiedenen Subpopulationen | 10 |
| 2.5.1 | Plasmazytoide dendritische Zellen..... | 10 |
| 2.5.2 | Konventionelle dendritische Zellen | 11 |
| 2.5.2.1 | Konventionelle DCs aus dem Blut..... | 11 |
| 2.5.2.2 | Konventionelle DCs aus dem Gewebe..... | 12 |
| 2.5.2.2.1 | Epidermale Langerhans Zellen..... | 12 |
| 2.5.2.2.2 | Dermale und interstitielle DCs..... | 13 |
| 2.5.3 | Follikuläre dendritische Zellen..... | 13 |
| 2.5.3.1 | Aktivierung von B-Lymphozyten | 13 |
| 2.5.3.2 | Verhinderung der Apoptose von B-Lymphozyten..... | 14 |
| 2.6 | Differenzierung und Migration..... | 15 |
| 2.6.1 | Chemokinrezeptoren der dendritischen Zellen | 16 |
| 2.6.2 | Chemokinrezeptoren der Langerhans Zellen | 17 |
| 2.6.3 | Von dendritischen Zellen gebildete Chemokine | 18 |
| 2.7 | Antigenaufnahme | 19 |
| 2.8 | Antigenprozessierung und –präsentation | 20 |
| 2.8.1 | Exogener bzw. endosomaler Weg der Antigenverarbeitung..... | 20 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 2.8.2 | Endogener bzw. proteosomaler Weg der Antigenverarbeitung | 21 |
| 2.8.3 | Kreuzpräsentation zellulärer Antigene | 22 |
| 2.8.4 | CD1-Präsentation | 24 |
| 2.9 | Kostimulatorische Moleküle..... | 24 |
| 2.9.1 | B7-Familie..... | 25 |
| 2.9.2 | TNF-Familie..... | 26 |
| 2.9.3 | Weitere kostimulatorische Moleküle | 27 |
| 2.10 | T-Zell-Gedächtnis, -Effektorfunktion und -Toleranz..... | 28 |
| 2.10.1 | Bildung von Gedächtniszellen | 28 |
| 2.10.2 | Bildung von Effektorzellen | 29 |
| 2.10.3 | Toleranz..... | 30 |
| 2.10.3.1 | Zentrale Toleranzmechanismen | 30 |
| 2.10.3.2 | Periphere Toleranzmechanismen | 31 |
| 2.11 | Rolle der DCs in Bezug auf die B-Zell-Funktion..... | 31 |
| 2.12 | Dendritische Zellen in der klinischen Anwendung | 32 |
| 2.12.1 | Dendritische Zellen als Impfadjuvanz..... | 32 |
| 2.12.2 | Dendritische Zellen und Transplantation | 33 |
| 2.12.3 | Dendritische Zellen in der Krebstherapie..... | 35 |
| 2.12.3.1 | Induktion natürlicher Killerzellen | 35 |
| 2.12.3.2 | Immunität gegen das gesamte Antigenrepertoire des Tumors | 35 |
| 2.12.3.3 | Adaptive Immuntherapie..... | 36 |
| 2.12.4 | DCs in der Therapie von Immun-vermittelten Krankheiten | 36 |
| 2.12.4.1 | Allergie..... | 37 |
| 2.12.4.1.1 | Asthma | 37 |
| 2.12.4.2 | Autoimmunkrankheit | 38 |
| 2.12.4.2.1 | Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis | 38 |
| 2.12.4.2.2 | Immuntherapie der EAE | 39 |
| 2.13 | Aviäre dendritische Zellen..... | 39 |
| 2.13.1 | Langerhans Zellen | 40 |
| 2.13.2 | Dendritische Zellen | 40 |
| 2.13.3 | Follikuläre dendritische Zellen..... | 41 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 3 | ZIELSETZUNG | 43 |
| 4 | MATERIAL UND METHODEN | 45 |
| 4.1 | Material..... | 45 |
| 4.1.1 | Tiere und Tierhaltung..... | 45 |
| 4.1.2 | Geräte in alphabetischer Reihenfolge | 45 |
| 4.1.3 | Chemikalien in alphabetischer Reihenfolge..... | 45 |
| 4.1.4 | Lösungen und Reagenzien in alphabetischer Reihenfolge..... | 46 |
| 4.1.5 | Antikörper | 48 |
| 4.1.5.1 | Primärantikörper..... | 48 |
| 4.1.5.1.1 | Verdünnung der Primärantikörper | 48 |
| 4.1.5.2 | Sekundärantikörper | 49 |
| 4.1.6 | Sonstiges Material in alphabetischer Reihenfolge | 49 |
| 4.2 | Methoden..... | 50 |
| 4.2.1 | Histologie | 50 |
| 4.2.1.1 | Organentnahme | 50 |
| 4.2.1.1.1 | Entnahme der Hautproben..... | 50 |
| 4.2.1.1.2 | Entnahme der Bursen | 50 |
| 4.2.1.1.3 | Entnahme der Lungen | 51 |
| 4.2.1.2 | Haltbarmachen der Organe..... | 51 |
| 4.2.1.2.1 | Fixierung der Proben für Paraffinschnitte..... | 51 |
| 4.2.1.2.1.1 | Haut- und Bursaproben | 51 |
| 4.2.1.2.1.2 | Lungenproben | 52 |
| 4.2.1.2.2 | Einfrieren der Proben für Gefrierschnitte..... | 53 |
| 4.2.1.2.2.1 | Haut- und Bursaproben | 53 |
| 4.2.1.2.2.2 | Lungenproben | 53 |
| 4.2.1.3 | Anfertigung der Schnitte | 54 |
| 4.2.1.3.1 | Anfertigung von Paraffinschnitten | 54 |
| 4.2.1.3.2 | Anfertigung von Gefrierschnitten | 54 |
| 4.2.1.4 | Hematoxylin-Eosin-Färbung an Paraffin- und Gefrierschnitten | 55 |
| 4.2.1.5 | Immunhistologie an Gefrierschnitten..... | 56 |
| 4.2.1.5.1 | Auswertungsverfahren | 57 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 5 | ERGEBNISSE..... | 59 |
| 5.1 | HE-Färbung der Haut | 59 |
| 5.1.1 | Allgemeine lichtmikroskopische Befunde der Haut | 59 |
| 5.1.1.1 | Epidermis der befiederten Haut..... | 61 |
| 5.1.1.2 | Korium der befiederten Haut..... | 62 |
| 5.1.1.3 | Epidermis der unbefiederten Haut..... | 62 |
| 5.1.1.3.1 | Epidermis der dorsalen Schuppenhaut am Mittelfuß | 62 |
| 5.1.1.3.2 | Epidermis der Kehllappen | 63 |
| 5.1.1.4 | Korium der unbefiederten Haut..... | 63 |
| 5.1.2 | Zusammenfassung..... | 64 |
| 5.2 | Immunhistologische Untersuchung der Haut..... | 64 |
| 5.2.1 | Färbung mit dem mAk 16-6 | 65 |
| 5.2.2 | Färbung mit dem mAk KUL01 | 66 |
| 5.2.3 | Färbung mit dem mAk 2G11..... | 67 |
| 5.2.4 | Färbung mit dem mAk 3-6 | 69 |
| 5.2.5 | Färbung mit dem mAk CVI-ChNL-68.1 | 71 |
| 5.2.6 | Färbung mit dem mAk CVI-ChNL-74.2..... | 72 |
| 5.2.7 | Färbung mit dem mAk CVI-ChNL-74.3..... | 74 |
| 5.2.8 | Färbung mit den mAks anti-TCR-1 und anti-TCR-2 | 74 |
| 5.2.9 | Negativkontrollen..... | 74 |
| 5.2.10 | Zusammenfassung..... | 74 |
| 5.3 | HE-Färbung der Bursa..... | 83 |
| 5.3.1 | Allgemeine lichtmikroskopische Befunde der Bursa..... | 83 |
| 5.3.2 | Zusammenfassung..... | 84 |
| 5.4 | Immunhistologische Untersuchung der Bursa | 85 |
| 5.4.1 | Färbung mit dem mAk 16-6 | 85 |
| 5.4.2 | Färbung mit dem mAk KUL01 | 86 |
| 5.4.3 | Färbung mit dem mAk 2G11 | 87 |
| 5.4.4 | Färbung mit dem mAk 3-6 | 88 |
| 5.4.5 | Färbung mit mAk CVI-ChNL-68.1..... | 89 |
| 5.4.6 | Färbung mit dem mAk CVI-ChNL-74.2..... | 91 |
| 5.4.7 | Färbung mit dem mAk CVI-ChNL-74.3..... | 92 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 5.4.8 | Negativkontrollen..... | 92 |
| 5.4.9 | Zusammenfassung..... | 92 |
| 5.5 | HE-Färbung der Lunge | 96 |
| 5.5.1 | Allgemeine lichtmikroskopische Befunde der Lunge..... | 96 |
| 5.5.1.1 | Primärbronchus | 97 |
| 5.5.1.2 | Sekundärbronchus | 98 |
| 5.5.1.3 | Follikel-assoziiertes Epithel (FAE)..... | 98 |
| 5.5.1.4 | Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe..... | 98 |
| 5.5.1.5 | Atrien..... | 99 |
| 5.5.1.6 | Interparabronchiales Bindegewebe | 99 |
| 5.5.2 | Zusammenfassung..... | 99 |
| 5.6 | Immunhistologische Untersuchung der Lunge..... | 100 |
| 5.6.1 | Färbung mit dem mAk 16-6..... | 100 |
| 5.6.2 | Färbung mit dem mAk KUL01 | 101 |
| 5.6.3 | Färbung mit dem mAk LD42..... | 102 |
| 5.6.4 | Färbung mit dem mAk 3-6..... | 102 |
| 5.6.5 | Färbung mit dem mAk CVI-ChNL-68.1..... | 103 |
| 5.6.6 | Färbung mit dem mAk CVI-ChNL-74.2..... | 104 |
| 5.6.7 | Färbung mit dem mAk CVI-ChNL-74.3..... | 105 |
| 5.6.8 | Negativkontrollen..... | 106 |
| 5.6.9 | Zusammenfassung..... | 106 |
| 6 | DISKUSSION..... | 110 |
| 6.1 | Struktur der Hühnerhaut..... | 110 |
| 6.2 | Myeloide Zellen in der Hühnerhaut | 111 |
| 6.3 | Lymphatisches System und Struktur der Bursa fabricii..... | 117 |
| 6.4 | Myeloide Zellen in der Bursa fabricii..... | 118 |
| 6.5 | Struktur der Hühnerlunge | 124 |
| 6.6 | Myeloide Zellen in der Hühnerlunge..... | 125 |

| | | |
|-----------|------------------------------------|------------|
| 7 | ZUSAMMENFASSUNG | 131 |
| 8 | SUMMARY | 133 |
| 9 | ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 135 |
| 10 | TABELLENVERZEICHNIS | 138 |
| 11 | LITERATURVERZEICHNIS | 139 |
| | DANKSAGUNG | 166 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---------------|--|
| ADP | Adenosin-Diphosphat |
| AG | Antigen |
| AICD | activation-induced cell death |
| AK | Antikörper |
| APC | Antigen-präsentierende Zelle |
| ATPase | Adenosintriphosphatase |
| Aqua dest. | Aqua destillata |
| BAFF/BLys | B-Zell-Aktivierungsfaktor der TNF-Familie |
| BALT | Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe |
| BCR | B-Zell-Rezeptor |
| BG | Birbeck Granula |
| β_2 M | β_2 -Mikroglobulin |
| CCR | C-Chemokinrezeptor |
| CD40L | CD40-Ligand |
| CD62L | CD62-Ligand |
| CLIP | class II-associated invariant-chain peptide |
| CMV | Zytomegalievirus |
| CR | Komplementrezeptor |
| CTL | zytotoxische T-Zelle |
| CXCR | CX-Chemokinrezeptor |
| CIITA | Klasse II Transaktivator |
| DAB | 3,3-Diaminobenzidin |
| DC | dendritische Zelle |
| DC-SIGN | DC-spezifisches, ICAM-3 aufgreifendes Nicht-Integrin |
| DISC | death-inducing signal complex |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EAE | experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis |
| ELC | Epstein-Barr Virus-induziertes Liganden Chemokin |
| ER | endoplasmatisches Retikulum |
| FAE | Follikel-assoziiertes Epithel |
| Fc γ R | Fc γ Rezeptor |
| FDC | follikuläre dendritische Zelle |

| | |
|----------------|--|
| FLIP | FAS-associated death domain-like IL-1-converting enzyme–inhibitory protein |
| Flt3L | Flt3 Ligand |
| fMLP | Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin |
| GC | germinales Zentrum |
| GM-CSF | Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor |
| GVHD | graft-versus-host disease |
| HE | Hematoxylin-Eosin |
| HEV | high endothelial venule |
| HSP | Hitzeschock-Protein |
| HSV | Herpes Simplex Virus |
| ICAM-1 | interzelluläres Adhäsionsmolekül |
| ICOS | inducible co-stimulator |
| Id | Inhibitor der DNA-Bindung |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| Ii | invariante Kette |
| IL | Interleukin |
| ILT | immunoglobulin-like transcript |
| iNOS | induzierbare Stickoxid Synthase |
| IP-10 | IFN- γ -induzierbares Protein-10 |
| LC | Langerhans Zelle |
| LCA | leukocyte common antigen |
| LFA-1 | Leukozytenfunktions-Antigen-1 |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LT α | Lymphotoxin- α |
| mAK | monoklonaler Antikörper |
| MBP | Myelin-Basis-Protein |
| MCP-1 | Monozyten-chemotaktisches Protein-1 |
| MDC | macrophage derived chemokine |
| MHC I | Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse I |
| MHC II | Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse II |
| Mig | monokine induced IFN- γ |
| MIP-1 α | Makrophagen-Entzündungsprotein-1 α |

| | |
|------------------|--|
| MIIC | an MHC II-Molekülen reiches Kompartment |
| MPS | mononukleäres Phagozytosesystem |
| NF κ B | nuclear factor-kappa B |
| NK | natürliche Killerzelle |
| NKT | natürliche T-Killerzelle |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| OVA | Ovalbumin |
| OX40L | OX40-Ligand |
| PAF | Plättchen-Aktivierungsfaktor |
| PARC | Lungen- und Aktivierungs-reguliertes Chemokin |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| pDC | plasmazytoide dendritische Zelle |
| PD-1 | programmed cell death-1 |
| PGE ₂ | Prostaglandin E ₂ |
| RANK | receptor activator of NF κ B |
| RANK-L | RANK-Ligand |
| RANTES Chemokin | regulated on activation normal T cell expressed and secreted chemokine |
| RSV | respiratorisches Synzytialvirus |
| SCID | severe combined immunodeficiency |
| SLC | secondary lymphoid organ chemokine |
| TAP | transporter associated with antigen processing |
| TARC | Thymus- und Aktivierungs-reguliertes Chemokin |
| TCR | T-Zell-Rezeptor |
| TCR- α | Prä-T-Zell-Rezeptor |
| TGF- β | transforming growth factor- β |
| Th | T-Helfer-Zelle |
| TLR | toll-like receptor |
| TNF- α | Tumor-Nekrose-Faktor- α |
| Tr | regulatorische T-Zelle |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

1 EINLEITUNG

Viele Erkenntnisse über grundlegende Mechanismen in der Entwicklung und Funktionsweise des Immunsystems stammen aus Arbeiten denen das Huhn als Tiermodell zugrunde lag. Nach und nach rückte jedoch mit der Maus als Tiermodell das Immunsystem des Mammaliens in den Vordergrund, nicht zuletzt deshalb, weil die Maus als Säugetier dem Menschen phylogenetisch naturgemäß wesentlich näher steht als das Huhn. Außerdem standen für das Säugermodell bald wesentlich mehr Werkzeuge zur Verfügung als dies beim aviären System der Fall war. Gerade in letzter Zeit, nicht zuletzt durch die pandemieartige Ausbreitung des auch für den Menschen potentiell gefährlichen Vogelgrippe-Virus H5N1, hat das Interesse für das aviäre Immunsystem jedoch wieder neuen Auftrieb erfahren. Auch die jährlich weltweit durch andere Infektionen hervorgerufenen wirtschaftlichen Verluste in Geflügelbetrieben dürften in dieser Hinsicht eine nicht zu unterschätzende Rolle spielen. Im Mittelpunkt des Interesses stehen dabei die Antigen-präsentierenden Zellen, wobei innerhalb dieser Population wiederum die dendritische Zelle von besonderer Bedeutung ist. Zumindest beim Säugetier sind ihre Funktionen als hocheffiziente Antigen-präsentierende Zelle sowie als potentester Aktivator naiver T-Zellen mittlerweile allgemein anerkannt. Nur ihrer Fähigkeit potentiell pathogene Antigene anhand von gruppenspezifischen Oberflächenmolekülen zu erkennen und die entsprechenden Antigenpeptide in den sekundären lymphatischen Organen einer immens großen Anzahl naiver T-Zellen zu präsentieren, ist letztendlich die hohe Wahrscheinlichkeit zu verdanken mit der eine T-Zelle auf das für sie spezifische Antigen trifft, die Grundvoraussetzung für jede erfolgreiche Immunantwort. Im Gegensatz zum Säugetier fehlen dem Vogel mit den Lymphknoten eine der wichtigsten Interaktionsstätten für Antigen-präsentierende Zellen und T-Zellen. Ein wichtiger Schritt bei der Erforschung des aviären Immunsystems wird es daher sein zu klären, ob eine funktionelle Analogie dendritischer Zellen von Säugern und Vögeln vorliegt und falls ja, welches lymphatische Organ des Vogels das Äquivalent zu den Lymphknoten der Säuger darstellt. Mittlerweile konnten mit IL-3, IL-4 und GM-CSF zumindest einige der für die *in vitro* Kultivierung aviärer dendritischer Zellen benötigten Zytokine kloniert werden. Auch die Auswahl an für aviäre myeloide Zellen spezifischen Antikörpern ist bereits deutlich größer als noch vor wenigen Jahren. Dennoch ist über die Funktion aviärer Immunzellen weiterhin sehr wenig bekannt. Grundlage für das Verständnis der Funktion einer Zellart ist jedoch das Wissen um ihre Morphologie und ihre Kompartimentierung bzw. Lokalisation innerhalb des Organismus. Im Zusammenhang mit

dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt dabei auf myeloide Zellen in der Haut, der Bursa und der Lunge des Haushuhns gelegt.

Die Haut wurde deshalb gewählt, da sie als größtes Organ des Organismus automatisch der stärksten Antigenexposition ausgesetzt ist und damit eine maßgebliche Rolle hinsichtlich der Abwehr sämtlicher exogener und damit potentiell pathogener Faktoren spielt. Man weiß zwar, dass Langerhans-ähnliche Zellen in der Epidermis des Haushuhns vorhanden sind und dass diese Zellen analog zu den Langerhans Zellen der Mammalier Birbeck Granula enthalten und MHC II-Moleküle und ATPase exprimieren. Über die Morphologie und Verteilung anderer myeloider Zellen und insbesondere über regionale Unterschiede innerhalb des Integumentum commune ist jedoch nichts bekannt.

Neben der Haut wird auch die Lunge von vielen Krankheitserregern als Eintrittspforte in den Organismus genutzt. Obwohl die Zellen der Immunabwehr in der Säugerlunge hinsichtlich ihrer Organisation und Verteilung bereits umfassend untersucht worden sind, liegen diesbezügliche Daten im Hühnermodell nur sehr spärlich vor. Da Vögel, wie bereits erwähnt, im Allgemeinen keine mit der Struktur und Funktionsweise der Säuger-Lymphknoten vergleichbaren Lymphknoten besitzen, die spezifische Abwehr jedoch stark von Interaktionen zwischen Lymphozyten und Antigen-präsentierenden Zellen abhängig ist, stellt sich die Frage an welchem anderen Ort ein solcher Kontakt stattfinden könnte. Aus diesem Grund sind die Lokalisationen der verschiedenen Subpopulationen myeloider Zellen und ihre Kompartimentierung innerhalb der Lunge auch für das Verständnis der Immunabwehr dieses Gewebes von elementarer Bedeutung.

Die Bursa schließlich stellt das am besten untersuchte aviäre Organ dar. Insbesondere die Entdeckung ihrer Funktion als Prägungsstätte der B-Lymphozyten erregte großes Aufsehen. Erst später erfolgte dann die Zuordnung des Knochenmarks als funktionelles Äquivalent der Säugetiere. Die Aufnahme löslicher Antigene aus der Umwelt über das Follikel-assoziierte Epithel der Bursafollikel ins Innere der Medulla ist ebenfalls schon seit langem bekannt. Trotzdem weiß man über den weiteren Weg dieser Substanzen nur wenig. Insbesondere die Einzelheiten der Prozessierung und Präsentation der Antigenfragmente werfen noch viele Fragen auf. Auch im Falle der Bursa ist daher das Wissen um die Lokalisation der verschiedenen Subpopulationen myeloider Zellen und ihre Kompartimentierung für das Verständnis der Funktion dieses Organs von grundlegender Bedeutung.

2 LITERATUR

2.1 Entdeckung der dendritischen Zellen

Obwohl die ersten dendritischen Zellen in Form ihres Prototyps, der Langerhans Zelle (LC), bereits Mitte des 19. Jahrhunderts entdeckt wurden, ist ihre überragende Bedeutung innerhalb des Immunsystems erst in den letzten Jahrzehnten richtig erkannt worden. Inzwischen ist allgemein anerkannt, dass die dendritischen Zellen (DCs) nicht nur als wichtige Vermittler zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunabwehr fungieren, sondern dass sie auch die bei weitem potentesten Stimulatoren naiver T-Zellen darstellen.

Ihr Entdecker, der Medizinstudent Paul Langerhans, stieß 1868 per Zufall auf besagte Zellart als er eine neue Methode einsetzte, die eigentlich zum Nachweis von Nervengewebe dienen sollte. Mit Hilfe dieser Methode, der Goldfärbung, beabsichtigte Langerhans die Morphologie der menschlichen Haut zu untersuchen (1). Ursprünglich wurden die LCs daher als Nervenzellen angesehen (1, 2), und es dauerte 100 Jahre bis ihre angeblich neuronale Herkunft experimentell widerlegt werden konnte (3).

Schließlich gelang es Steinman und Cohn Mitte der 70er Jahre DCs zuerst aus der Milz von Mäusen, danach auch aus anderen peripheren lymphatischen Organen dieser Tierart zu isolieren (4). Obwohl natürlich Unterschiede zu den Systemen anderer Spezies bestehen, stellt die Maus ein geeignetes Modell für den Mammalier dar, so dass seitdem insbesondere die murinen DCs umfassend und gründlich untersucht worden sind.

Was die Population der epidermalen LCs betrifft, so konnten Katz et al. 1979 den Nachweis einer Abstammung von Knochenmarksstammzellen erbringen (5). Später gelang es sogar die generelle Abstammung *aller* DC-Vorläuferzellen von CD34⁺ Knochenmarksstammzellen beziehungsweise von Monozyten nachzuweisen (6-8).

Während der 80er Jahre wurden die LCs dann besonders intensiv untersucht. Es gelang spezifisch gegen LCs gerichtete Antikörper (AK) zu entwickeln, mit deren Hilfe man die Zellen in Hautpräparationen identifizieren und isolieren konnte. Ein entscheidender Schritt wenn man bedenkt, dass die LCs nur zwei bis drei Prozent der Zellpopulation der Haut repräsentieren. Mit Hilfe dieser spezifischen Marker war es nun möglich, die Struktur der LCs besser zu verstehen und ihre Verteilung in den unterschiedlichen Geweben zu untersuchen. Immer mehr wurde man sich dabei auch der herausragenden Bedeutung bewusst, welche die LCs hinsichtlich einer Ziel gerichteten und effektiven Immunantwort haben (9-11).

2.2 Differenzierungsstadien der dendritischen Zelle

Grundsätzlich werden bei den DCs drei verschiedene Differenzierungsstadien unterschieden, die weder phänotypisch noch funktionell miteinander vergleichbar sind: einerseits die im Blut zirkulierenden Vorläufer-DCs, weiterhin die unreifen DCs in den peripheren Geweben und schließlich die reifen DCs, die in die peripheren lymphatischen Organe migriert sind.

Die Vorläufer der DCs, CD34⁺ Knochenmarkstammzellen, werden über den Blutstrom im gesamten Organismus verteilt. Daher können auch in fast allen nicht-lymphatischen Organen DCs nachgewiesen werden. In den peripheren Geweben angelangt, entwickeln sich die Vorläuferzellen anschließend zu so genannten unreifen DCs. Diese besitzen bereits baumartig verzweigte Fortsätze, denen sie auch ihren Namen verdanken (griechisch: dendron = Baum). Die unreifen DCs besitzen die Fähigkeit sowohl durch Rezeptor-vermittelte als auch durch Rezeptor-unabhängige Mechanismen Antigene (AG) aufzunehmen und diese in endozytotischen Vesikeln zu verarbeiten. Die für die Präsentation der entstehenden Peptide an Lymphozyten notwendigen Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes der Klasse II (MHC II) werden zu diesem Zeitpunkt jedoch nur in äußerst geringer Menge exprimiert.

Treten nun zusätzlich zur Antigenexposition endogene oder exogene Gefahrensignale auf kommt es zur so genannten Reifung. Diese beruht in erster Linie auf einer Änderung des Expressionsmusters auf der Zelloberfläche. So existieren beispielsweise auf der Oberfläche unreifer DCs andere Chemokinrezeptoren als auf der Oberfläche reifer DCs. Diese speziellen Oberflächenmoleküle unreifer Zellen sind für deren Einwanderung in entzündlich veränderte Gebiete verantwortlich, da sie auf inflammatorische Zytokine reagieren (12-14). Reife DCs dagegen exprimieren auf ihrer Oberfläche stattdessen eine hohe Dichte an MHC II:AG-Komplexen sowie kostimulatorische Moleküle zur Unterstützung der Proliferation CD4⁺ T-Zellen.

Die solchermaßen aktivierten DCs beginnen nun über das Blutgefäßsystem in die peripheren lymphatischen Organen einzuwandern, wo sie in engen Kontakt zu den naiven T-Lymphozyten treten. Die T-Lymphozyten wiederum erreichen die peripheren lymphatischen Organe ebenfalls über den Blutweg. Von dort gelangen sie anschließend in die efferenten Lymphgefäße und via dem Ductus thoracicus wieder in das Blutgefäßsystem. Diese Rezirkulation wird erst dann unterbrochen, wenn es zu einer Interaktion zwischen einer AG-präsentierenden DC und einer für dieses AG spezifischen naiven T-Zelle kommt.

Stark vereinfacht kann man sagen, dass die naive T-Zelle durch diesen Kontakt zur klonalen Expansion und Differenzierung zur Effektor-T-Zelle angeregt wird (7, 8, 11) (Einzelheiten dazu siehe Kapitel 2.9). Je nachdem ob es sich bei der betreffenden T-Zelle nun um einen

CD4⁺ Lymphozyten oder um einen CD8⁺ Lymphozyten handelt, erfolgt ihre Differenzierung entweder zur T-Helfer-Zelle (Th) oder zur zytotoxischen T-Zelle (CTL).

Die unterschiedlichen Funktionen der DCs sind also eng mit ihrem jeweiligen Reifestadium korreliert. Problematisch dabei ist allerdings die Tatsache, dass der Reifungsprozess ursprünglich ausschließlich an LCs untersucht wurde. Dies führte letztendlich dazu, dass die phänotypischen Veränderungen, welche die Zellen während ihrer Reifung durchlaufen, und die Korrelation dieser Veränderungen mit der Lokalisation der Zellen im Gewebe sowie mit ihrer Funktion über einen langen Zeitraum hinweg als allgemeingültiges Dogma für sämtliche Formen der DCs angesehen wurden (15). Dabei ist jedoch übersehen worden, dass sich die verschiedenen (Sub-)Populationen der DCs nicht nur morphologisch unterscheiden, sondern dass sie auch eine sehr starke funktionelle Heterogenität aufweisen. Gerade in den letzten Jahren ist dieses Problem jedoch intensiver untersucht worden. Dabei wurde immer deutlicher, dass es sich bei den DCs um wesentlich komplexere Zellen handelt als ursprünglich angenommen. So variiert ihre Morphologie und Funktion nicht nur innerhalb der verschiedenen Spezies erheblich, sondern zum Teil treten sogar innerhalb derselben Population erhebliche Unterschiede auf, je nach Entwicklungs- und Reifegrad. Es ist daher fast unmöglich allgemeingültige Aussagen hinsichtlich der DCs zu treffen.

2.3 Isolierung dendritischer Zellen

Die früheren Methoden zur Isolierung dendritischer Zellen beruhten auf der enzymatischen Verdauung von aus Mäusen gewonnenen Geweben. Um die gewonnenen Zellen besser differenzieren zu können wurde anschließend nur auf diejenigen mit geringer physikalischer Dichte selektiert, was zur Anreicherung der mononuklearen Zellen führte. Um schließlich noch die B- und T-Lymphozyten zu eliminieren erfolgte eine Selektion auf Adhärenz. Die weiteren Schritte zur Anreicherung der gewünschten DC Population bestanden aus einer Vielzahl verschiedener Kombinationen negativer und positiver Selektionsverfahren.

Als wichtigstes Beispiel für ein negatives Selektionsverfahren wäre die Phagozytose kleiner Partikel aus Quarz, Carbonyleisen oder Latex zu nennen, da Makrophagen hinsichtlich der Aufnahme dieser Partikel deutlich potenter sind als DCs und daher leicht erkannt und eliminiert werden können. Die positiven Selektionsverfahren beruhen insbesondere auf den verschiedenen Möglichkeiten der Kombination monoklonaler Antikörper (mAk). Dabei werden diejenigen Zellen isoliert, die wichtige für DCs relevante Marker auf ihrer Oberfläche exprimieren, wie beispielsweise MHC II-Moleküle oder den myeloiden Marker CD11c.

Heutzutage stellt die Gewinnung von DCs aus Knochenmark oder Blut eine weitere und deutlich effizientere Möglichkeit der Generierung von DCs dar. Effizienter deshalb, weil man bei dieser *in vitro*-Methode die Bildung der Zellen mit Hilfe von unterschiedlichen Wachstumsfaktoren oder Kombinationen verschiedener Wachstumsfaktoren aus Vorläufer-DCs anregen kann. Die Anzahl dieser Vorläufer in Knochenmark und Blut ist dabei naturgemäß wesentlich höher als die Anzahl der unreifen DCs im Gewebe. Standardmäßig werden dafür Wachstumsfaktoren wie GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor) (16), TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor- α) (17), IL-4 (Interleukin-4) (18), TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1) (19) oder Flt3L (Flt3 Ligand) (20) eingesetzt. Die Kombination von GM-CSF mit IL-4 oder TNF- α und anderen Zytokinen bietet sich dabei insbesondere für die Generierung von interstitiellen DCs und LCs an, wobei LCs für ihre Differenzierung zusätzlich TGF- β benötigen (19, 21). Für die Bildung von plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) ist dagegen das Zytokin IL-3 essentiell. Flt3L wiederum findet Verwendung, um die Proliferation von Stamm- und Vorläuferzellen *in vitro* zu stimulieren und führt *in vivo* zur Ausbreitung und Mobilisierung sämtlicher DCs und ihrer Vorläufer (20, 22).

2.4 Einteilung der dendritischen Zellen

Grundsätzlich muss man bei den dendritischen Zellen zwischen zwei großen Populationen differenzieren, den plasmazytoiden DCs lymphatischen Ursprungs auf der einen sowie den konventionellen DCs myeloider Herkunft auf der anderen Seite.

Daneben existieren noch die so genannten follikulären dendritischen Zellen (FDCs). Bei den FDCs handelt es sich eigentlich um Stromazellen, die aber auf Grund ihrer Lokalisation und ihrer Form als DCs bezeichnet werden.

2.4.1 Plasmazytoide dendritische Zellen

Die pDCs verdanken ihren Namen der Tatsache, dass sie auf ultrastrukturellem Niveau Immunglobulin (Ig)-sezernierenden Plasmazellen ähneln, weswegen sie ursprünglich als „plasmazytoide“ T-Zellen oder „plasmazytoide Monozyten“ bezeichnet wurden (23-25). Man findet sie in den T-Zell-Bereichen lymphatischer Organe sowie im Thymus und im Blut. Mittlerweile weiß man, dass es sich bei den pDCs weder um Lymphozyten noch um Monozyten handelt und dass sie keine oder nur eine sehr untergeordnete Rolle bei der AG-Präsentation zur Induktion einer adaptiven Immunantwort spielen. Dennoch sind sie von

großer Bedeutung, insbesondere was die Abwehr viraler Infektionen betrifft. Dies hängt vor allem mit ihrer Fähigkeit zusammen große Mengen an Interferon- (IFN-)TypI, also an IFN- α und/oder IFN- β zu produzieren (24, 26, 27), einen der potentesten Suppressoren der viralen Replikation (26). Neben dieser Eigenschaft soll IFN auch in der Lage sein andere DCs zu aktivieren, beispielsweise DCs die für den Vorgang der Kreuzpräsentation relevant sind (28) (siehe Kapitel 2.8.3).

pDCs unterscheiden sich jedoch nicht nur hinsichtlich ihrer Fähigkeit IFN-TypI zu produzieren erheblich von den konventionellen DCs, sondern ebenfalls was ihre Oberflächenantigene betrifft. So weisen sie beim Menschen den einzigartigen Phänotyp CD11c^{-/+} CD4⁺ CD123⁺ CD45Ra⁺ HLA-DR⁺ auf, der sich unter anderem durch die sehr geringe Menge an dem Molekül CD11c auszeichnet (29).

Die Vorläuferzellen der pDCs exprimieren auf ihrer Oberfläche den CD62-Liganden (CD62L) sowie den Chemokinrezeptor CXCR3. Mit Hilfe dieser Moleküle sind sie wiederum in der Lage direkt aus dem Blut über spezielle Venolen, die HEVs (high endothelial venules), in die Lymphknoten einzuwandern, sobald sie durch entsprechende inflammatorische Zytokine dazu stimuliert werden (26).

Im Unterschied zu den LCs und den interstitiellen DCs weisen die Vorläuferzellen der pDCs lediglich eine geringe Expression des GM-CSF-Rezeptors auf, außerdem fehlen ihnen die myeloiden Marker CD13, CD14 und CD33 sowie die Rezeptoren für Mannose (24), was als ein Hinweis auf ihren lymphatischen Ursprung gedeutet wird. Weitere Hinweise auf diesen Ursprung stellt die Expression von TCR- α - (Prä-T-Zell-Rezeptor-)Transkripten durch die Vorläufer der pDCs dar (30, 31) sowie die Tatsache, dass diese Zellen ILT3 (immunoglobulin-like transcript) Rezeptor produzieren. Im Gegensatz dazu bilden die myeloiden DCs sowohl ILT3 als auch ILT1. Als zusätzlicher Hinweis ist auch zu werten, dass die ektopische Expression von Id2 (Inhibitor der DNA-Bindung2) bzw. Id3 die Entwicklung CD34⁺ Vorläuferzellen in die CD123⁺ Vorläufer der plasmazytoiden DCs, der B- und der T-Lymphozyten verhindert, nicht aber die Bildung myeloider DCs (32).

Zwischen pDCs und LCs respektive interstitiellen DCs existiert jedoch auch eine Gemeinsamkeit. Jede einzelne dieser Populationen ist in der Lage, naive CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten zu stimulieren und, nach Aktivierung durch CD40L, größere Mengen an IL-12 freizusetzen (33, 34).

2.4.2 Konventionelle dendritische Zellen

Auch die konventionellen DCs können in zwei Gruppen unterteilt werden, nämlich einmal in solche die sich aus dem Blut ableiten, und in solche die aus dem Gewebe stammen.

2.4.2.1 Konventionelle DCs aus dem Blut

Die konventionellen, sich von Blutzellen ableitenden DCs setzen sich aus drei verschiedenen Subpopulationen zusammen, nämlich den CD8⁺ DCs, den CD4⁺ DCs sowie den CD4⁻ CD8⁻ DCs. Sie besiedeln neben den Lymphknoten auch die Milz (35, 36), die bekanntermaßen keinerlei Lymphdurchfluss aufweist. Dabei ist noch nicht ganz klar, ob die Zellen als Vorläuferzellen in der Milz eintreffen oder ob sie zu diesem Zeitpunkt bereits völlig ausdifferenziert sind.

Neben den CD8⁺ DCs sind im Übrigen auch pDCs in der Lage CD8 α zu exprimieren, insbesondere nach Aktivierung (37). Da aber pDCs gleichzeitig CD45RA auf ihrer Oberfläche aufweisen, kann leicht zwischen diesen und den konventionellen CD8⁺ DCs differenziert werden (38).

2.4.2.2 Konventionelle DCs aus dem Gewebe

Lymphknoten deren afferente Bahnen Lymphflüssigkeit aus dem Bereich der Haut transportieren enthalten DC-Subpopulationen, die als definitiv aus dem Gewebe stammende DCs betrachtet werden müssen. Zum einen handelt es sich dabei um die epidermalen LCs und zum anderen um die dermalen bzw. interstitiellen DCs.

Durch das Oberflächenmolekül CD205, welches nur die konventionellen DCs aus dem Gewebe exprimieren, können diese gut von aus dem Blut stammenden DCs unterschieden werden. Eine Ausnahme bilden hierbei lediglich die CD8⁺ konventionellen DCs aus dem Blut, da sie ebenfalls CD205 exprimieren (37). Um eine Abgrenzung von den CD8⁺ DCs zu ermöglichen, ist es notwendig die Oberflächenexpression der Moleküle CD8 und CD11b heranzuziehen. Während die aus dem Gewebe stammenden DCs eine relativ geringe Menge an CD8-Molekülen und eine wesentlich höhere Konzentration an CD11b-Molekülen aufweisen, verhält es sich bei den CD8⁺ DCs aus dem Blut genau umgekehrt (38).

Um wiederum zwischen LCs und interstitiellen DCs differenzieren zu können gibt es grundsätzlich zwei verschiedene Möglichkeiten. Entweder man vergleicht die Menge an CD205, welches von LCs in erheblich größerem Umfang gebildet wird als von interstitiellen DCs, oder man überprüft das intrazelluläre Vorliegen von Langerin, ein für LCs relativ

spezifisches Lektin, welches von diesen in großen Mengen gebildet wird (39), von interstitiellen DCs dagegen kaum.

Da außer der Haut kein anderes Organ LCs enthält können diese Zellen folglich auch nur in den die Haut drainierenden Lymphknoten gefunden werden. Nicht-kutane Lymphknoten dagegen enthalten eigene interstitielle DCs, welche analog zu den dermalen DCs zu sein scheinen.

Außer Acht gelassen werden darf auch nicht die Möglichkeit, dass eventuell noch ganz andere, nur für bestimmte Organe spezifische Subpopulationen von DCs existieren könnten, dass also die Unterteilung in insgesamt sechs Subpopulationen, eine plasmazytoide und fünf konventionelle, unter Umständen noch gar nicht vollständig ist.

2.4.3 Follikuläre dendritische Zellen

Bei den FDCs handelt es sich, wie schon kurz angedeutet, nicht um DCs im eigentlichen Sinne, sondern vielmehr um in den Primär- und Sekundärfollikeln lymphatischer Organe lokalisierte Stromazellen. Ihren Namen verdanken diese Zellen einerseits ihrer Lokalisation und andererseits ihren strahlenförmigen, an DCs erinnernden Zytoplasmafortsätzen. Ursprünglich wurden die FDCs auch als Retikulumzellen, retikuläre Fibroblasten oder als dendritische Retikulumzellen angesprochen (40-42). Schließlich wurde die Bezeichnung „follikuläre dendritische Zelle“ eingeführt, um eine bessere Abgrenzung von den in den T-Zell-Bereichen lymphatischer Organen lokalisierten interdigitierenden DCs zu erreichen (43). Die Bezeichnung „interdigitierend“ rührt daher, dass sich diese DCs bereits in engem Kontakt mit einem T-Lymphozyten befinden. Dabei hat es den Anschein als würden sie ihre Zytoplasmafortsätze wie „Finger“ einsetzen, um das Gegenüber zu umklammern.

Die Kultivierung von FDCs ist allerdings kaum möglich. Dies liegt unter anderem daran, dass es *in vitro* zu einer raschen Änderung des Phänotyps kommt. Man hat sich deshalb auf die folgende Definition für FDCs geeinigt: unter FDCs versteht man Zellen *die in bestimmten Abschnitten der Lymphfollikel identifiziert werden, und die Immunkomplexe sowohl binden als auch speichern können* (43).

FDCs besitzen also die Fähigkeit AG über lange Zeiträume hinweg zu speichern und sie in Form von AG:AK-Komplexen auf ihrer Zelloberfläche an B- und T-Lymphozyten zu präsentieren. Außerdem sind sie auch in der Lage die Apoptose von GC (germinales Zentrum) B-Lymphozyten zu verhindern und deren zelluläre Interaktionen und Proliferation zu fördern. Yoshida et al. konnten zeigen, dass in der Milz der Maus mindestens zwei funktionell unterschiedliche Subpopulationen an FDCs existieren, nämlich einmal eine kleine

Subpopulation in den Sekundärfollikeln die Immunkomplexe mit Hilfe von Fc γ II-Rezeptoren präsentiert, sowie eine deutlich größere Population die nicht nur in den Sekundär-, sondern auch in den Primärfollikeln anzutreffen ist und sich zur Präsentation der Immunkomplexe verschiedener Komplementrezeptoren (CRs) bedient (44).

Zur Entwicklung reifer FDCs aus ihren Vorläufern sind enge Interaktionen mit der Mikroumwelt von Nöten, welche auch Signale sich entwickelnder GC B-Lymphozyten mit einschließen. Umgekehrt erfordert die Ausbildung einer geeigneten Mikroumwelt wiederum Interaktionen mit den in den Follikeln enthaltenen, sich entwickelnden FDCs, so dass eine wechselseitige Abhängigkeit besteht (45, 46).

Bei der Maus scheinen für die Entwicklung eines FDC-Netzwerks im GC sowohl B- als auch T-Lymphozyten eine essentielle Rolle zu spielen (47, 48). Sehr eindrucksvoll konnte dies bei an SCID (severe combined immunodeficiency) erkrankten Mäusen gezeigt werden. Diese Mäuse besitzen weder B- noch T-Lymphozyten und sind daher auch nicht in der Lage FDCs zu generieren. Dies ändert sich jedoch umgehend, wenn man ihnen allogene, also von anderen Mäusen stammende Lymphozyten überträgt (49, 50).

Für die Entwicklung der murinen FDCs scheint dabei besonders die Aktivierung von B- durch T-Lymphozyten entscheidend zu sein, was durch die unzureichende Bildung von GCs bei CD40- bzw. CD40L-knockout Mäusen gezeigt werden konnte (51, 52).

Zahlreiche Untersuchungen mit genmanipulierten Mäusen haben außerdem gezeigt, dass für die Interaktion zwischen FDCs und lymphatischen Zellen verschiedene Mitglieder der TNF-Familie respektive die entsprechenden Rezeptoren essentiell sind, zum Beispiel TNF- α , LT (Lymphotoxin) α oder LT β auf B-Lymphozyten oder die kompatiblen Rezeptoren auf den FDCs (53-55). Zwar sind auch Mäuse mit geschädigtem BAFF/BLys (B-Zell-Aktivierungsfaktor der TNF-Familie) in der Lage nach Immunisierung GCs zu bilden, diese sind jedoch deutlich kleiner als bei den Kontrolltieren und weisen eine geringere Halbwertszeit auf (56, 57). Auch das Netzwerk aus FDCs ist bei den BAFF-geschädigten Mäusen nicht adäquat organisiert, was ebenfalls als ein Hinweis darauf zu werten ist, dass für die Reifung und die Stabilität der FDCs Interaktionen mit B-Lymphozyten unerlässlich sind.

2.5 Funktionen der verschiedenen Subpopulationen

2.5.1 Plasmazytoide dendritische Zellen

Wie schon erwähnt sind pDCs dazu befähigt große Mengen an IFN-TypI zu produzieren. Auslöser einer solchen Produktion können die verschiedensten Stimuli sein, insbesondere

aber TLR- (toll-like receptor-)Liganden oder Virusprodukte (58-60). Unter den TLRs versteht man eine Reihe gruppenspezifischer Rezeptoren auf der Oberfläche AG-präsentierender Zellen (APCs). Entdeckt wurden sie erstmals bei der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*), einem Insekt das zwar kein erworbenes Immunsystem besitzt, aber dennoch als hochresistent gegenüber mikrobiellen Infektionen einzustufen ist. Bald erkannte man, dass die Ligation dieser Rezeptoren auch beim Säugetier als Gefahrensignal dient und daher eine große Bedeutung hat, beispielsweise was die Aktivierung unreifer DCs betrifft.

Welche Rolle das von pDCs gebildete Interferon innerhalb der Immunabwehr letztendlich genau spielt, ist noch nicht bis ins letzte Detail geklärt. Es scheint jedoch insbesondere für die Suppression der viralen Replikation sowie für die Aktivierung von für die Kreuzpräsentation relevanten DCs von essentieller Bedeutung zu sein (28).

2.5.2 Konventionelle dendritische Zellen

2.5.2.1 Konventionelle DCs aus dem Blut

Was die drei sich von Blutzellen ableitenden Subpopulationen betrifft, so ist insbesondere über die Funktion der $CD4^+$ DCs sowie der $CD4^- CD8^-$ DCs noch sehr wenig bekannt. Es gibt jedoch zumindest einige Hinweise darauf, dass die $CD4^- CD8^-$ DCs in der Lage sind $IFN-\gamma$ zu produzieren (61), während bei den $CD4^+$ DCs bis dato noch keine signifikante Zytokinbildung beobachtet werden konnte. Zusammen bilden diese beiden Subpopulationen die $CD8^-$ DC-Milzgruppe, die in Th2-Antworten involviert zu sein scheint (62).

Die $CD8^+$ DCs dagegen haben eine relativ gut dokumentierte Funktion innerhalb des Immunsystems. Sie dominieren in den T-Zell-Bereichen lymphatischer Organe (22, 63, 64), insbesondere in der Milz. Hier besiedeln sie die periarteriellen lymphatischen Scheiden, während die $CD4^+$ DCs sowie die $CD4^- CD8^-$ DCs unter normalen Bedingungen nur in der marginalen Zone der Milz anzutreffen sind und nur dann in die T-Zell-Bereiche eindringen, wenn sie aktivierenden Stimuli wie beispielsweise LPS (Lipopolysaccharid) ausgesetzt waren (63).

Als wichtigste Produzenten des Zytokins IL-12 (64) spielen die $CD8^+$ DCs eine wesentliche Rolle für die T-Zell-Aktivierung und dabei besonders für die Proliferation der $CD8^+$ T-Zellen. Die Frage ob eine naive T-Zelle ihrem spezifischen Antigen gegenüber eine Toleranz entwickelt oder nicht scheint dabei maßgeblich von den $CD8^+$ DCs beeinflusst zu werden (65).

Zum Zeitpunkt der Reifung der DCs beeinflussen verschiedene Faktoren in ihrer Mikroumwelt die Fähigkeit zur Produktion von IL-12. Werden große Mengen an IL-12 sezerniert kommt es zur Förderung der Th1-Antwort. Ist die Fähigkeit zur IL-12 Bildung jedoch supprimiert, wird eher eine Th2-Antwort induziert (66). Sowohl bei den an den Th1-Antworten als auch bei den an den Th2-Antworten beteiligten Zellarten handelt es sich um Subpopulationen von CD4⁺ Zellen. Die T-Helfer-Zellen (Th) induzieren dabei die Aktivierung von Makrophagen und regen B-Zellen zur Bildung opsonisierender AK an (Th1-Antwort), während die zytotoxischen T-Zellen (CTLs) zwar auch verschiedene Effekte auf Makrophagen ausüben, in erster Linie jedoch bei B-Zellen zur Synthese neutralisierender AK führen (Th2-Antwort).

Es gibt allerdings auch Hinweise darauf, dass von myeloiden DCs in den ersten 24 Stunden nach der Interaktion mit einem naiven T-Lymphozyten grundsätzlich erst einmal IL-12 freigesetzt und damit Th1-Antworten gefördert werden, bis es danach zur Bildung IL-4 sezernierender T-Zellen kommt, so dass schließlich doch die Th2-Antwort überwiegt (34).

Ebenfalls nicht zu unterschätzen ist auch die zentrale Rolle der CD8⁺ DCs hinsichtlich der so genannten Kreuzaktivierung (67) bzw. der Induktion der Kreuztoleranz (68, 69). In Kapitel 2.8.2 werden diese Mechanismen noch genauer beschrieben.

2.5.2.2 Konventionelle DCs aus dem Gewebe

2.5.2.2.1 Epidermale Langerhans Zellen

Die Langerhans Zellen stellen die am besten untersuchte Population der dendritischen Zellen dar (70). Lokalisiert im Epithel der äußeren Haut kontrollieren sie das Eindringen von Pathogenen und anderen äußeren Faktoren. Man nimmt an dass der Kontakt mit einem Pathogen zur Migration der betroffenen LCs zum regionalen Lymphknoten führt, wo es auch zur Induktion der T-Zell-Immunität kommt. Während jedoch die Phagozytose von AG durch LCs sowie ihre anschließende Migration als erwiesen anzusehen sind, gibt es nur spärliche Beweise dafür, dass die für die Aktivierung der T-Zellen erforderliche AG-Präsentation ebenfalls direkt durch die LCs bewerkstelligt wird. Auch in neueren Untersuchungen konnte nur eine indirekte bzw. zufällige Beteiligung dieser Zellen hinsichtlich der AG-Präsentation an T-Zellen nachgewiesen werden (71). Man nimmt in diesem Fall an, dass andere DC-Populationen die Präsentation durchführen, nachdem sie das AG von den eingewanderten LCs übernommen haben.

Am Beispiel des HSV (Herpes Simplex Virus) konnte gezeigt werden, dass die LCs im Falle dieses Pathogens definitiv nicht für die Aktivierung der virusspezifischen CTLs

verantwortlich gemacht werden können (72, 73), sondern dass diese Aufgabe von den CD8⁺ DCs übernommen wird (72). Es ist also davon auszugehen, dass die LCs entweder nur unter bestimmten Bedingungen naive, antigenspezifische T-Zellen aktivieren können oder dass sie eventuell lediglich als Transportmedium fungieren, während die eigentliche AG-Präsentation von anderen DC-Subpopulationen übernommen wird.

2.5.2.2.2 Dermale und interstitielle DCs

Die dermalen DCs aus der Haut sowie die interstitiellen DCs aus den anderen Geweben sind zum Großteil CD11b⁺ CD205⁺ CD8⁻ (37). Sie unterscheiden sich von den LCs dahingehend, dass sie keine Birbeck Granula (BG) enthalten und geringere Mengen an CD205 exprimieren. Bei den BG handelt es sich um charakteristische Strukturen im Zytoplasma der LCs. Sie entstehen aus Einstülpungen der Zytoplasmamembran, wobei ihre genaue Funktion bis dato noch nicht geklärt ist. Eventuell spielen sie eine Rolle für spezielle Formen der adsorptiven Endozytose.

Es gibt nur einige wenige Anhaltspunkte dafür, dass dermale bzw. interstitielle DCs in der Lage sind die Immunantwort durch die Produktion bestimmter Zytokine entweder in Richtung Th1-Antwort, also der zellulären Immunantwort, oder in Richtung Th2-Antwort, der humoralen Immunantwort, zu lenken. Bewiesen ist bisher lediglich, dass sie lösliche Antigene sehr effizient kreuzpräsentieren können, während ihnen das bei Zell-assoziierten AG nicht möglich zu sein scheint (74).

2.5.3 Follikuläre dendritische Zellen

Wie schon erwähnt, sind die FDCs in der Lage AG in Form von AG:AK-Komplexen auf ihrer Zelloberfläche zu präsentieren. Im Gegensatz zu den professionellen APCs nehmen die FDCs die AG jedoch weder in sich auf noch prozessieren sie sie und auch die Präsentation findet nicht im Zusammenhang mit MHC II-Molekülen statt, sondern entweder über Fc- oder über Komplement-Rezeptoren.

2.5.3.1 Aktivierung von B-Lymphozyten

Die gebildeten Komplexe sind dabei extrem stabil, so dass sie über einen Zeitraum von einigen Monaten bis hin zu einigen Jahren auf der extrazellulären Oberfläche der Plasmamembran der FDCs verbleiben können (75). Zumindest *in vitro* sind diese Komplexe auch wesentlich potenter als lösliche AG was die Aktivierung von B-Zellen betrifft (76, 77).

So gelingt es nur denjenigen GC B-Lymphozyten zu überleben und in Gedächtnis- oder Plasmazellen zu differenzieren, die Immunkomplexe gebunden haben.

Dieses Dogma wird allerdings durch jüngere Daten mit einer speziellen Mäuselinie erschüttert. Die betroffenen Mäuse können entweder keine Komplementrezeptoren oder keine Immunglobuline (Ig) produzieren und dennoch kommt es zur Bildung von GC und zur AK-Produktion. Die Daten belegen also, dass weder die Bildung von GC noch die Produktion von AK durch die Abwesenheit von AG:AK-Komplexen beeinträchtigt wird, und dass somit die Differenzierung der B-Lymphozyten nicht ausschließlich von den Immunkomplexen der FDCs abhängt (78, 79).

Doch obwohl diese Kontroverse hinsichtlich der Bedeutung der von den FDCs präsentierten Immunkomplexe noch nicht gelöst ist, kann man die wichtige Rolle welche die FDCs für das Überleben und die Proliferation der GC B-Lymphozyten spielen als erwiesen ansehen (75, 80, 81).

2.5.3.2 Verhinderung der Apoptose von B-Lymphozyten

Die meisten GC B-Lymphozyten durchlaufen initial zahlreiche Mitosen, bevor sie entweder durch die Interaktion mit dem spezifischen AG selektiert werden oder in Apoptose übergehen (82, 83).

Neuere Studien haben ergeben dass die GC B-Lymphozyten, sobald sie einen neuen B-Zell-Rezeptor (BCR) exprimieren, auf die Interaktion mit dem FDC-Netzwerk angewiesen sind um der Apoptose zu entgehen.

Durch diese Interaktionen wird u.a. ein spezielles Endonuklease-Programm abgeschaltet, welches anderenfalls zum programmierten Zelltod führen würde (84-86). Außerdem unterdrücken die AG-abhängigen FDC-B-Zell-Interaktionen die Aktivität der Kaspasen 8 und 3 sowie der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (87, 88). Sie neutralisieren auch die Aktivität von Cathepsin-B, während das Potential der mitochondrialen Membranen aufrechterhalten wird (88). Der FAS- (CD95-)medierte Weg, der mit der Apoptose der GC B-Zellen in Verbindung gebracht wird (89, 90), wird durch die FDC-B-Zell-Interaktionen ebenfalls blockiert (90-92). Allerdings wird die Rolle von FAS noch recht kontrovers diskutiert, was unter anderem daran liegt, dass die genaue Herkunft sowie der zeitliche Ablauf der Expression von CD95L durch die GC weiterhin unbekannt sind. Als Quelle kommen sowohl FDCs (93, 94) als auch aktivierte GC T-Lymphozyten in Betracht (94). FLIP (FAS-associated death domain-like IL-1-converting enzyme-inhibitory protein) verhindert die CD95-medierte Apoptose der GC B-Lymphozyten, sobald es mit dem DISC (death-inducing signal complex) assoziiert (88, 95).

FDCs könnten also eine Rolle hinsichtlich der Verhinderung der CD95-medierte Apoptose spielen, indem es dank der Expression von FLIP durch die GC B-Lymphozyten (96) zu einer Interaktion zwischen BCR (91) und FDC kommt, wodurch wiederum eine positive Selektion stattfinden kann (75).

2.6 Differenzierung und Migration

Aus dem bisher gesagten ist schon deutlich hervorgegangen, dass es sich bei den DCs anfänglich nicht um „stationäre“, sondern um umherwandernde Zellen handelt, die an verschiedenen Lokalisationen unterschiedliche Funktionen ausüben (14, 97, 98).

Dabei zirkulieren, wie bereits erwähnt, die aus dem Knochenmark stammenden Vorläuferzellen der DCs im Blut, bis sie schließlich in die peripheren Gewebe einwandern, wo sie zu unreifen DCs differenzieren und als eine Art Wächter für die unmittelbare Umwelt fungieren.

Der Austritt der Vorläuferzellen aus den Gefäßen ins periphere Gewebe sowie die weitere Migration der DCs aus dem Gewebe in die lymphatischen Organe ist an das Vorhandensein von Chemokinen gebunden. Unter einem Chemokin versteht man ein spezielles Protein, das wiederum –je nach Rezeptor– anziehend auf bestimmte Arten von Zellen wirkt. Auf molekularer Ebene wird diese Anziehungskraft dadurch erreicht, dass die Chemokine G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktivieren, die auf der Oberfläche von Leukozyten exprimiert werden. Auf diese Weise können die Chemokine äußerst effizient die Rekrutierung von Entzündungszellen regulieren (99-101).

Die Bildung der inflammatorischen Chemokine erfolgt dabei als Antwort auf verschiedene Entzündungsreize in der Peripherie durch endotheliale und epitheliale Zellen sowie durch Leukozyten. In den sekundären lymphatischen Organen wie der Milz oder den Lymphknoten werden dagegen stetig von endothelialen Zellen, Stromazellen und Leukozyten Chemokine produziert, deren Aufgabe darin besteht, die Interaktionen zwischen DCs, T- und B-Lymphozyten zu regulieren (102, 103).

Durch die Kompartimentierung der inflammatorischen Chemokine innerhalb der peripheren Gewebe beziehungsweise der konstitutiven Chemokine in den lymphatischen Organen wird eine fein abgestimmte Regulation der DCs erreicht, die auf diese Weise zuerst zum Bereich der Antigenexposition geleitet werden und erst danach die lymphatischen Gewebe erreichen, um eine Immunantwort zu initiieren.

2.6.1 Chemokinrezeptoren der dendritischen Zellen

Die Fähigkeit der DCs adäquat auf die verschiedenen Chemokine zu reagieren ist unmittelbar an ihren Reifestatus gekoppelt. Im Zuge der Reifung wird die Expression der Rezeptoren für inflammatorische Chemokine zu Gunsten derjenigen Rezeptoren gedrosselt, welche für die konstitutiven bzw. lymphatischen Chemokine relevant sind.

So exprimieren beispielsweise murine von CD34⁺ Vorläuferzellen abstammende unreife DCs sowohl C-Chemokinrezeptoren (CCR) als auch CX-Chemokinrezeptoren (CXCR) wie CCR1, CCR2, CCR5 und CXCR1. Hierbei handelt es sich ausschließlich um Rezeptoren für inflammatorische Chemokine wie MCP-1 (Monozyten-chemotaktisches Protein-1) (104), MIP-1 α (Makrophagen-Entzündungsprotein-1 α), MIP-1 β und RANTES (regulated on activation normal T cell expressed and secreted) Chemokin (105-107) (**Abb. 2-1**).

Unreife DCs, aber auch Makrophagen, besitzen zusätzlich noch Rezeptoren für Spaltprodukte bakterieller Proteine wie fMLP (Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin), Produkte der Komplementaktivierung wie z.B. C5a (104, 108) sowie Produkte des Fettstoffwechsels wie PAF (Plättchenaktivierungs-Faktor) (109).

Die Migration der unreifen DCs in Richtung entzündlich veränderter Bereiche führt unweigerlich auch dazu, dass die Zellen nicht nur einer steigenden Konzentration inflammatorischer Chemokine, sondern auch größeren Mengen proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-1 sowie den vom Pathogen gebildeten, für die Entzündung verantwortlichen Produkten ausgesetzt sind. Als Antwort auf diese Exposition kommt es zur Reifung und damit zur verstärkten Expression von Rezeptoren für die konstitutiven bzw. lymphatischen Chemokine, auf Kosten der mit den inflammatorischen Chemokinen kompatiblen Rezeptoren.

Der Rückgang der letztgenannten Rezeptoren wird zumindest teilweise durch die autokrine Sekretion von MIP-1 α , MIP-1 β sowie RANTES durch reifende DCs hervorgerufen, da die Expression der entsprechenden Rezeptoren bei Ligation heruntergefahren wird (110). Damit erscheint weniger CCR1, CCR5 und CXCR1 auf der Zelloberfläche, während die Menge an CXCR4, CCR4 und insbesondere CCR7 ansteigt. Der letztgenannte Rezeptor reagiert auf SLC (secondary lymphoid organ chemokine), ein Chemokin aus den sekundären lymphatischen Geweben, sowie auf ELC (Epstein-Barr Virus-induziertes Liganden Chemokin).

SLC wird von lymphatischen Endothelzellen gebildet sowie von Stromazellen und DCs in den T-Zell-Bereichen lymphatischer Organe. Die beiden letztgenannten Zellpopulationen sind zusätzlich in der Lage ELC zu produzieren (111-113). Die anatomische Lage der SLC- und

der ELC-Bildung bedingt, dass die DCs anfänglich weg von den peripheren Geweben und hin zu den das betreffende Gebiet drainierenden afferenten Lymphbahnen geleitet werden, und von hier dann wiederum zu den T-Zell-Bereichen der lymphatischen Gewebe.

Der Rezeptor CCR7 wird teilweise auch von naiven T- und B-Lymphozyten exprimiert, was zur Folge hat, dass diese Zellarten ebenfalls dazu in der Lage sind in lymphatische Gewebe einzuwandern (114). Eine weitere Besonderheit dieses Rezeptors besteht darin, dass er völlig unempfindlich für das schon beschriebene Herunterregulieren der Expression durch die entsprechenden Liganden ist (110). Offensichtlich spielt das permanente Vorkommen dieses Rezeptors auf der Zelloberfläche der DCs eine wichtige Rolle, um den Zellen die schrittweise Annäherung aus den peripheren Geweben hin zu den lymphatischen Organen zu ermöglichen. Unterstützt wird diese These ebenfalls durch die Tatsache, dass es reifenden DCs bei Mäusen, die nicht in der Lage sind CCR7 zu exprimieren, nicht gelingt in die Lymphknoten einzuwandern (115).

Im Zuge der Reifung der DCs kommt es auch zu einer unterschiedlichen Regulation der Rezeptoren für bakterielle Antigene und für Komplement. Reifende DCs regulieren ihre Rezeptoren für fMLP herunter und werden daher weniger empfänglich für diese Substanzen, während gleichzeitig die Expression der Rezeptoren für das Produkt C5a der Komplementaktivierung permanent aufrechterhalten wird. Yang et al. vertreten dabei die These, dass die Interaktion von C5a mit seinem Rezeptor zur Einwanderung reifer DCs in B-Zell-Follikel lymphatischer Organe beiträgt, da naive B-Lymphozyten C5a bilden und gleichzeitig auf die reifen DCs als Antigenquelle angewiesen sind (116).

2.6.2 Chemokinrezeptoren der Langerhans Zellen

LCs unterscheiden sich von den anderen myeloiden DCs dahingehend, dass sie als Chemokinrezeptoren zusätzlich noch CCR6 produzieren (111, 117, 118) (**Abb. 2-1**). Bei dem Liganden für diesen Chemokinrezeptor handelt es sich um MIP-3 α , welches bei Mäusen ständig in den Follikel-assoziierten Epithelien der Peyerschen Platten gebildet wird (118-120). Die Funktion dieses Rezeptor-Liganden-Paars besteht daher nicht nur in der Rekrutierung unreifer DCs in entzündlich veränderte Gebiete, sondern führt auch zur Einwanderung unreifer DCs in nicht-entzündete Gewebe, wo sie als eine Art Wächter fungieren.

Im Zuge der Reifung der LCs kommt es schließlich zur Reduktion der CCR6 Expression, während gleichzeitig die Bildung von CCR7 angekurbelt wird, um den reifenden LCs das Aufsuchen der lymphatischen Gewebe zu ermöglichen.

2.6.3 Von dendritischen Zellen gebildete Chemokine

Im Verlauf einer entzündlichen Reaktion werden von den DCs jedoch nicht nur Chemokinrezeptoren gebildet, sondern es kommt parallel und genau abgestimmt auch zur Synthese der für die Rezeptoren kompatiblen Chemokine (98, 121, 122). Die bereits erwähnte autokrine Produktion von Rezeptorliganden zur Reduktion der Expression bestimmter Rezeptoren wäre ein solches Beispiel (110). Unreife DCs produzieren permanent MCP-4, welches sowohl an den ebenfalls von unreifen DCs gebildeten Chemokinrezeptor CCR2 bindet als auch an CCR3, einen Rezeptor der als potentieller Marker für eine Subpopulation von Th2-Zellen angesehen wird (123). Mit Beginn der Reifung kommt es zu einem raschen Herunterfahren des MCP-4 und zur vorübergehenden Bildung inflammatorischer Chemokine wie MIP-1 α , MIP-1 β und IL-8. Andere inflammatorische Chemokine wie RANTES, MCP-1 und MCP-2 werden ebenfalls produziert, jedoch für einen wesentlich längeren Zeitraum (**Abb. 2-1**).

Sobald die reifen DCs die T-Zell-Bereiche der lymphatischen Organe erreichen, produzieren sie große Mengen lymphatischer Chemokine wie ELC, MDC (macrophage derived chemokine), TARC (Thymus- und Aktivierungs-reguliertes Chemokin), PARC (Lungen- und Aktivierungs-reguliertes Chemokin) sowie IP-10 (IFN- γ -induzierbares Protein-10) (110, 124, 125). Diese Chemokine sind insbesondere für die Rekrutierung von T-Zellen erforderlich, da so die Chancen eines Kontakts zwischen AG-präsentierender DC und einer für dieses AG spezifischen T-Zelle stark erhöht werden. Bei IP-10 handelt es sich um ein Chemokin, welches die Migration plasmazytoider DCs mediiert, welche direkt aus dem Blut in die lymphatischen Organe gelangen können, ohne wie die myeloiden DCs einen Umweg über das lymphatische System nehmen zu müssen. Ermöglicht wird ihnen das durch den IP-10 Rezeptor CXCR3, welcher ebenfalls das von reifen DCs gebildete Mig (monokine induced IFN- γ) binden kann. Dabei gelangen die pDCs zunächst mit Hilfe von IP-10 und Mig in die Bereiche der HEVs, welche sie dann wiederum aufgrund des von ihnen exprimierten Liganden für CD62 (CD62L) passieren können (126). Im Inneren der Lymphknoten werden sie durch das Vorhandensein von CD40L auf vor kurzem aktivierten T-Lymphozyten stimuliert, was zu ihrer Reifung beiträgt und dazu führt, dass sie bei fortdauernder Bildung von IFN- α mit der Produktion von IL-12 beginnen (34). IFN- α hat wiederum eine verlängerte Produktion von IL-12 durch die myeloiden DCs zur Folge und damit eine verlängerte Phase während der es zur Induktion von Th1-Antworten kommt.

Die genannten Chemokine spielen jedoch nicht nur bei der Interaktion zwischen DCs und naiven T-Zellen, die letztendlich zur Bildung von Effektor-T-Lymphozyten führt, eine Rolle,

sondern auch bei der Differenzierung einiger dieser Effektor-T-Zellen zu so genannten unpolarisierten Gedächtnis-T-Zellen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch die einzigartigen Migrationseigenschaften sowie die streng kontrollierte, zeitlich begrenzte Freisetzung von IL-12 durch myeloide und plasmazytoide DCs jeweils zum richtigen Zeitpunkt die richtige Art der T-Helfer-Zelle generiert wird (127).

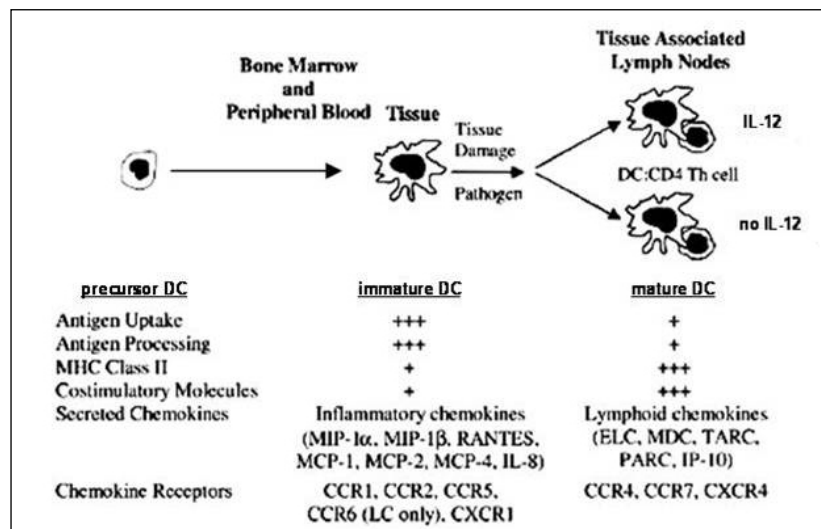


Abb.2-1: Migrations- und Reifungspfade dendritischer Zellen, modifiziert nach Lipscomb und Masten (127).

2.7 Antigenaufnahme

Von Makrophagen ist allgemein bekannt, dass es sich um stark phagozytierende Zellen handelt, welche die aufgenommenen Substanzen durch die Fusion von Phagosomen und Lysosomen respektive durch enzymatische Verdauung rasch zerkleinern und damit inaktivieren.

Die DCs dagegen wurden lange Zeit als weder phagozytierende noch endozytierende Zellen angesehen, was unter Umständen mit der Abwesenheit makrophagenspezifischer Phagozytosemechanismen zusammenhängt.

Heute wissen wir, dass zumindest die unreifen DCs eine hohe phagozytotische Potenz aufweisen, während die reifen DCs diese Fähigkeit tatsächlich auf ein Minimum reduziert haben (128). Diese unreifen DCs sind sogar in der Lage ganze Zellen aufzunehmen, einschließlich nekrotischer und apoptotischer Zellen. Zusätzlich haben sie die Fähigkeit AG von lebenden Zellen zu übernehmen, um sie CTLs zu präsentieren (129).

Die Aufnahme der AG kann dabei, wie bereits erwähnt, sowohl durch Rezeptor-abhängige als auch durch Rezeptor-unabhängige Mechanismen erfolgen. Bei den Rezeptor-abhängigen

Mechanismen differenziert man wiederum zwischen der Phagozytose und der Pinozytose. Im ersteren Fall werden korpuskuläre Partikel aufgenommen, während sich die Pinozytose auf lösliche Substanzen beschränkt. Zu den Rezeptoren die allen oder zumindest einigen der verschiedenen DC-Subpopulationen zu Eigen sind gehören die $Fc\gamma$ Rezeptoren ($Fc\gamma R$) CD32 und CD64, die high and low-affinity IgE Rezeptoren $Fc\epsilon RI$ und $Fc\epsilon RII$ (CD23), die Komplementrezeptoren CD11b und CD11c, der Mannan-bindende Rezeptor vom C-Lektin Typ DE205 (CD205) sowie das „Fressrezeptorenpaar“ für apoptotische Zellen $\alpha_v\beta_5$ und CD36 (7, 130). Im Zuge der Reifung, wenn die phagozytotische Kapazität stark nachlässt, wird auch die Expression dieser Rezeptoren wieder herunter reguliert.

Der Rezeptor-unabhängige Mechanismus wird als so genannte Makropinozytose bezeichnet. Dabei werden große Mengen interzellulärer Flüssigkeit mitsamt den darin gelösten Stoffen in ungerichteter Weise aufgenommen.

2.8 Antigenprozessierung und –präsentation

Grundsätzlich muss man bei der AG-Prozessierung durch DCs zwischen zwei unterschiedlichen Möglichkeiten differenzieren. Auf der einen Seite steht der so genannte exogene bzw. endosomale Weg, mit dessen Hilfe exogene AG prozessiert werden, und auf der anderen Seite handelt es sich um den endogenen bzw. proteosomalen Weg, der für die Verarbeitung der endogenen AG relevant ist.

2.8.1 Exogener bzw. endosomaler Weg der Antigenverarbeitung

Exogene von DCs aufgenommene AG gelangen in endosomale Kompartimente, die sich durch einen niedrigen pH-Wert sowie das Vorhandensein verschiedener Proteasen auszeichnen, die für die Verdauung der AG verantwortlich sind.

Die gebildeten Fragmente gelangen anschließend ins endosomale MIIC (an MHC II-Molekülen reiches, endosomales Kompartiment), wo sie sich mit den dort enthaltenen präformierten MHC II-Molekülen verbinden.

Die α - und β -Ketten dieser MHC II-Moleküle werden wiederum im endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert, wo sie mit der so genannten invarianten Kette (Ii) assoziieren (131). Diese Kette schützt die Peptid-bindende Grube des MHC II-Heterodimers davor mit Autopeptiden beladen zu werden. Der Komplex aus MHC II-Molekül und Ii wird anschließend aus dem ER zum Golgi-Apparat transportiert, von wo aus die Komplexe über Vesikel zum MIIC gelangen. Hier erfolgt eine partielle Spaltung der Ii durch bestimmte

Proteasen, was zur Entstehung von CLIP (class II-associated invariant-chain peptide) in der Peptid-bindenden Grube des MHC II-Moleküls führt (132). Bei der Maus wird CLIP schließlich durch das Molekül H-2M entfernt, welches strukturell dem MHC II-Molekül entspricht. Durch diesen Schritt wird erreicht, dass sich die Peptidfragmente der aufgenommenen AG mit den MHC II-Molekülen verbinden können (133).

Über spezielle exozytotische Vesikel gelangen die MHCII:Antigenpeptid-Komplexe danach an die Zelloberfläche, wo sie den naiven $CD4^+$ T-Lymphozyten präsentiert werden können. Über andere, endozytotische Vesikel gelangen die MHC II-Moleküle wieder ins MIIC zurück, um erneut mit Peptidfragmenten beladen zu werden.

Unreife DCs akkumulieren die MHC II-Moleküle und Peptidfragmente in lysosomalen Vesikeln solange, bis sie aktiviert werden. Nach der Aktivierung werden die betreffenden Komplexe in nicht-lysosomalen Vesikeln gesammelt, die zur Zelloberfläche wandern. Dabei konnte gezeigt werden, dass Mitglieder der B7-Familie kostimulatorischer Moleküle in den vesikulären Lipiden enthalten sind und zusammen mit den MHC II:Antigenpeptid-Komplexen an die Zelloberfläche transportiert werden (134). Auf die genaue Einteilung und Funktion der kostimulatorischen Moleküle soll im Kapitel 2.9 noch genauer eingegangen werden.

2.8.2 Endogener bzw. proteosomaler Weg der Antigenverarbeitung

Endogene AG werden im Gegensatz zu exogenen AG mit Hilfe von MHC I-Molekülen $CD8^+$ T-Lymphozyten präsentiert. Dazu erfolgt zunächst die Zerlegung der zytoplasmatischen Proteine in so genannten Proteosomen. Der Transport der entstehenden Peptide wird vermutlich durch aus dem Zytosol stammende Hitzeschock-Proteine (HSP) erleichtert. Diese begleiten die Peptide auf ihrem Weg über das heterodimere Protein TAP (transporter associated with antigen processing) ins ER (135).

Im ER bilden neu synthetisierte MHC I α -Ketten Komplexe mit dem β_2 -Mikroglobulin (β_2M), welche die ankommenden AG-Peptide binden. Die adäquate Faltung der MHC I/ β_2M -Komplexe ist jedoch nur mit Hilfe von Chaperon-Proteinen wie Calnexin, Calretikulin und HSP gp96 möglich, während Tapasin die Bildung der MHC I/ β_2M /Peptid-Komplexe erleichtert (97, 136). Schließlich kommt es zur Aufnahme der Komplexe in exozytotische Vesikel und zum Transport an die Zelloberfläche.

Ursprünglich ging man davon aus, dass über den Weg der proteosomalen AG-Verarbeitung ausschließlich endogene, also im Inneren der APCs synthetisierte Proteine verarbeitet werden. Mittlerweile weiß man jedoch, dass auch exogene Antigene unter bestimmten Umständen in Proteosomen aufgenommen werden können, um anschließend auf die gleiche Art und Weise

wie die endogenen AG-Peptide mit Hilfe von TAP ins ER zu gelangen und über MHC I-Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert zu werden (137, 138) (**Abb. 2-2**). Durch diesen als Kreuzpräsentation bezeichneten Prozess kann es sowohl zur Induktion einer produktiven Immunantwort (Kreuzaktivierung) als auch zur Kreuztoleranz von CD8⁺ T-Lymphozyten kommen. Damit existiert mit der Kreuzpräsentation auf der einen Seite ein wichtiger Mechanismus zur lückenlosen Abwehr von Pathogenen, da es beispielsweise Viren nicht mehr möglich ist durch die Umgehung der Infektion von DCs den CTLs zu entkommen, und auf der anderen Seite stellt sie eine Möglichkeit dar, CD8⁺ T-Zellen tolerant gegenüber körpereigenen Zellen und Geweben zu machen.

2.8.3 Kreuzpräsentation zellulärer Antigene

Alle kernhaltigen Zellen eines Organismus sind ausnahmslos dazu in der Lage, Peptide im Zusammenhang mit MHC I-Molekülen zu präsentieren. Dadurch werden sie, beispielsweise im Falle einer Infektion mit einem Virus, durch CTLs als befallene Zellen erkannt und vernichtet, was einen wichtigen Mechanismus zur Verhinderung der viralen Replikation darstellt. Der an MHC I-Moleküle gekoppelte Weg der AG-Präsentation ist jedoch größtenteils auf Proteine endogener Herkunft beschränkt. Auf diese Weise wird verhindert, dass nicht-infizierte Nachbarzellen, die lediglich Teile des Virus durch Endozytose aufgenommen haben, ebenfalls durch die CTLs zerstört werden.

Einige wenige Zellarten, darunter B-Zellen (139), Endothelzellen (140, 141) und Makrophagen (142-144), insbesondere aber die DCs, besitzen zusätzlich die Fähigkeit auch exogene Antigene im Kontext mit MHC I-Molekülen zu präsentieren, eine Eigenschaft die -wie bereits erwähnt- auch als Kreuzpräsentation bezeichnet wird und dem „direkten“ oder „klassischen“ Weg der Präsentation endogen gebildeter Proteine gegenübersteht.

Ohne den Mechanismus der Kreuzpräsentation könnten beispielsweise Viren der Erkennung durch das Immunsystem entgehen, indem sie einfach die Infektion von DCs vermeiden. Die Präsentation von AG durch diese Zellen scheint nämlich essentiell für die Induktion von Immunantworten zu sein. Da durch die Kreuzpräsentation jedoch auch exogene Antigene über MHC I-Moleküle an naive CD8⁺ T-Zellen präsentiert werden können, existiert keine Lücke über die es den Viren gelingen könnte der Abwehr durch CTLs zu entkommen. Dabei lassen die Ergebnisse mehrerer Studien vermuten, dass es sich bei den für die Kreuzpräsentation der zellulären AG verantwortlichen Zellen in erster Linie um CD8⁺ DCs handelt (67, 145, 146), während dermale/interstitielle DCs nur peripher beteiligt zu sein scheinen.

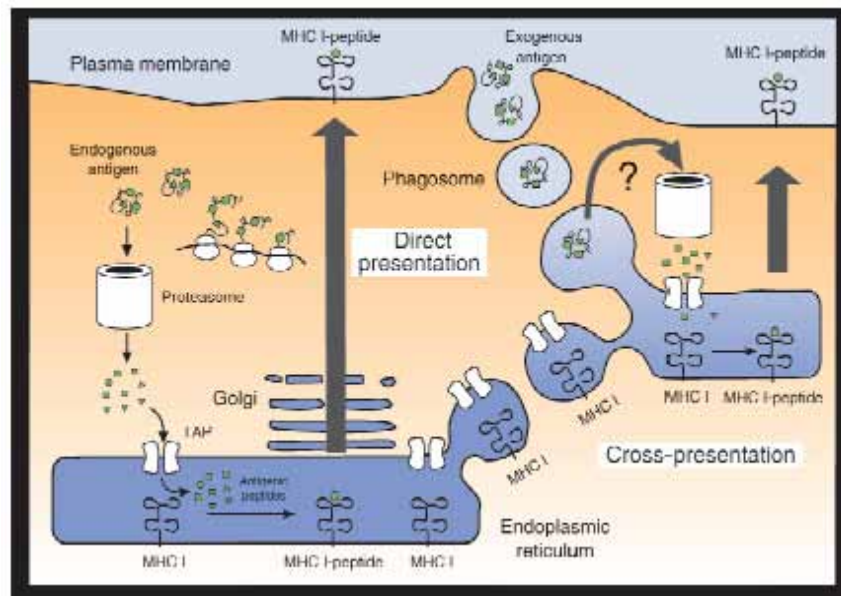


Abb.2-2: Wege der MHC I-Präsentation, nach Heath et al. (38).

Über die genauen Mechanismen der Kreuzpräsentation ist jedoch noch nicht allzu viel bekannt. Mehrere Gruppen konnten den Vorgang einer Verschmelzung von Phagosomen mit vom ER abstammenden Vesikeln beobachten (147-149). In den daraus entstehenden Kompartimenten wurden wiederum neben neu synthetisierten MHC I-Molekülen auch die anderen für eine erfolgreiche Beladung dieser Moleküle notwendigen Proteine wie TAP, Tapasin, Calretikulin und ERp57 nachgewiesen (150).

Über einen noch ungeklärten Mechanismus werden die phagozytierten AG anschließend zum angrenzenden Zytosol transportiert, wobei eventuell ein aus mehreren Molekülen bestehender Kanal beteiligt ist, dessen normale Funktion darin besteht, sezernierte Proteine oder Membranproteine ins ER hinein beziehungsweise Polypeptide aus dem ER hinaus ins Zytosol zu transportieren (151-153). Im Zytosol werden die exogenen AG schließlich durch assoziierte Proteasomen prozessiert, wobei die daraus entstehenden Peptide danach mit Hilfe des TAP-Komplexes wieder zurück ins Phagosom gelangen, wo die Beladung der Klasse I-Moleküle erfolgt.

Was die Kreuzpräsentation ebenfalls vom klassischen Weg der MHC I-Präsentation unterscheidet ist die Tatsache, dass die mit Peptidfragmenten beladenen MHC I-Moleküle vom ER direkt an die Zelloberfläche gelangen, ohne einen Umweg über den Golgi-Apparat zu nehmen (**Abb. 2-2**) (147, 154).

Was wiederum die kreuzpräsentierten AG betrifft, so hat man es mit einer ziemlich heterogenen Gruppe zu tun, welche sowohl lösliche Proteine (155) als auch Immunkomplexe (156, 157), intrazelluläre Bakterien (137), Parasiten (158) und vor allem zelluläre AG

(159-161) mit einschließt. Letztere können im Zusammenhang mit Virusinfektionen, Tumorgenese oder aber durch Immunisierung mit DNA (Desoxyribonukleinsäure) auftreten und stellen eine der Hauptquellen für die Kreuzpräsentation dar.

2.8.4 CD1-Präsentation

Neben den MHC-Molekülen existiert noch eine weitere Familie von Histokompatibilitätsantigenen. Es handelt sich dabei um die so genannten CD1-Moleküle. Diese bilden eine Gruppe nicht-polymorpher Histokompatibilitätsantigene, die wie die MHC I-Moleküle mit β_2M assoziiert sind (162, 163).

Da man die CD1-Moleküle nur auf myeloiden DCs findet, können sie als Marker für die Identifikation dieser Zellen herangezogen werden. Es existieren verschiedene Isoformen der CD1-Moleküle, wobei deren Anzahl speziesabhängig sehr variiert. So unterscheidet man bei der Maus nur zwei Homologe, nämlich CD1d1 und CD1d2. Auf ultrastruktureller Ebene wird ersichtlich, dass das murine CD1d1-Molekül insbesondere zur Bindung stark hydrophober Liganden geeignet ist, was auch mit seiner Fähigkeit übereinstimmt AG-Lipide zu präsentieren (164). Dabei spielt es keine Rolle ob die präsentierten Lipide oder Glykolipide exogener oder endogener Herkunft sind.

Die Verarbeitung und Präsentation der AG unterscheidet sich jedoch nicht unerheblich von der für MHC I- und MHC II-Molekülen beschriebenen Art. Zwar werden die CD1-Moleküle wie die α - und β -Ketten der MHC II-Moleküle im ER synthetisiert, mit Hilfe kleiner Vesikel werden sie jedoch anschließend direkt an die Zelloberfläche transportiert. Im Anschluss erfolgt die Aufnahme in Endosomen wo es zur Komplexbildung zwischen den CD1-Molekülen und ihren Lipidliganden kommt, worauf ein erneuter Transport an die Zelloberfläche stattfindet. Shinkai und Locksley vertreten dabei die These, dass die Aufgabe dieser archaischen, phylogenetisch sehr alten, nicht-polymorphen Moleküle weniger darin besteht eine protektive Immunantwort zu induzieren, als vielmehr die physiologischen Wege des Fettstoffwechsels zu ermöglichen (163).

2.9 Kostimulatorische Moleküle

Damit es den professionellen APCs gelingt naive T-Lymphozyten soweit zu aktivieren, dass diese zu Effektor-T-Zellen differenzieren, bedarf es einiger Voraussetzungen deren Bezeichnung sich unter den Oberbegriffen Signal 1, Signal 2 sowie Signal 3 eingebürgert hat.

Unter dem Signal 1 versteht man die Bindung zwischen dem T-Zell-Rezeptor (TCR) und dem von der APC präsentierten MHC:Antigenpeptid-Komplex. Um zu verhindern dass auch präsentierte Autopeptide eine Immunantwort auslösen, müssen jedoch zusätzlich so genannte kostimulatorische Moleküle exprimiert werden, eine Fähigkeit durch die sich die professionellen APCs von anderen AG-präsentierenden Körperzellen unterscheiden. Die Präsentation ebenjener kostimulatorischen Moleküle auf der Zelloberfläche der APCs wird als Signal 2 bezeichnet.

Unter dem Signal 3 schließlich versteht man die Bildung von IL-2. Es wird von durch die Signale 1 und 2 bereits aktivierten T-Lymphozyten gebildet und ist für deren Proliferation und Differenzierung unerlässlich. Neben IL-2 produzieren diese T-Zellen auch die α -Kette des IL-2 Rezeptors. Da naive T-Lymphozyten nur die β - und die γ -Kette des IL-2 Rezeptors exprimieren, wird durch das Signal 3 die Affinität dieses Rezeptors zu seinem Liganden stark erhöht.

2.9.1 B7-Familie

Die kostimulatorischen Moleküle werden je nach Struktur und Funktion in verschiedene Familien eingeteilt. Die ersten und zugleich die wichtigsten kostimulatorischen Moleküle die charakterisiert wurden waren Mitglieder der so genannten B7-Familie. Es handelte sich dabei um CD28 auf naiven T-Zellen sowie um die korrespondierenden Liganden CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2), deren Synthese von reifenden APCs gesteigert wird (165, 166). Mittlerweile weiß man, dass diese Unterfamilie noch weitere Mitglieder aufweist und zur Ig-Superfamilie gehört.

Später wurde noch CTLA-4 identifiziert, ein Molekül mit starker Homologie zu CD28, welches von aktivierten T-Lymphozyten gebildet wird, mit einer höheren Affinität an CD80 und CD86 bindet als CD28 und als regulatorisches Molekül die Immunantwort herunterfährt (167). Solche Moleküle sind ein elementarer Bestandteil der Mechanismen, welche ein Überschießen der Immunantwort und damit die Entstehung von Autoimmunkrankheiten verhindern.

Ein weiteres Mitglied der B7 Familie wird durch B7RP-1 repräsentiert. B7RP-1 wird in erster Linie von B-Zellen exprimiert, in geringerem Ausmaß jedoch auch von Makrophagen, DCs und nicht-lymphatischen Gewebezellen. Es fungiert als Ligand für das induzierbare Protein ICOS (inducible co-stimulator) (168-170). ICOS ist strukturell mit CD28 verwandt und wird, wie auch CTLA-4, von aktivierten T-Zellen gebildet (171). ICOS-knockout Mäuse leiden an massiven Störungen der T-Zell-abhängigen Th Immunantwort, wobei sowohl der Spiegel

Th2-abhängiger AK vom Isotyp IgG1 als auch der Spiegel Th1-abhängiger AK vom Isotyp Ig2a im Serum vermindert ist (172-174).

Ein Mitglied der B7-Familie, PD-L1 (B7HI), wird konstitutiv von DCs gebildet und bindet an den PD-1 (programmed cell death-1) Rezeptor auf T-Zellen (165). Durch diese Interaktion wird ein hemmender Effekt auf die Proliferation und die Zytokinproduktion der T-Lymphozyten ausgeübt.

Das verwandte Molekül PD-L2 hat eine ähnlich inhibierend wirkende Funktion, bindet ebenfalls an PD-1, scheint aber insbesondere bei durch Th2-Zellen bedingten Entzündungsreaktionen beteiligt zu sein, während PD-L1 eher bei durch Th1-Zellen verursachten Entzündungen eine Rolle spielt (165).

Vor wenigen Jahren konnte schließlich noch das Molekül B7-H3 identifiziert und kloniert werden (175). B7-H3 wird im Gegensatz zu den meisten anderen Molekülen der B7-Familie von unreifen DCs in großen Mengen synthetisiert, während reife DCs die Expression drastisch herunter regulieren. Es übt einen fördernden Einfluss im Sinne der Kostimulation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie bei der Induktion der IFN- γ Produktion aus, was recht erstaunlich ist wenn man bedenkt, dass es primär von unreifen DCs exprimiert wird. Der Ligand für B7-H3 ist zwar noch unbekannt, es handelt sich jedoch definitiv nicht um CD28, CTLA-4, ICOS oder PD-1.

2.9.2 TNF-Familie

Die TNF-Familie der Rezeptoren respektive Liganden umfasst derzeit ca. 50 bekannte Mitglieder. Auch bei dieser Familie handelt es sich um wichtige Kostimulatoren hinsichtlich der DC-T-Zell-Interaktion.

Besonders bemerkenswert ist die Interaktion von CD40 auf DCs mit CD40L (CD154) auf T-Zellen. Ursprünglich wurde CD40 als wichtiges B-Zell-Molekül identifiziert welches mit CD40L auf T-Lymphozyten interagiert, was wiederum den Wechsel der Isotypen ermöglicht. Im Zuge von Interaktionen zwischen AG-präsentierenden DCs und T-Zellen mit kompatibelem TCR kommt es ebenfalls zu einer verstärkten Expression von CD40L. Dieser verbindet sich dann wiederum mit CD40 auf den reifen DCs und fördert so die Freisetzung von IL-12, welches bekanntermaßen für die Th1-Polarisation essentiell ist (176, 177).

Zwei weitere wichtige Mitglieder der TNF-Familie werden durch OX40 auf T-Zellen respektive durch OX40-Ligand (OX40L) auf DCs repräsentiert und spielen eine ähnliche Rolle hinsichtlich der Proliferation der T-Lymphozyten und ihrer Zytokinproduktion, insbesondere was die Synthese von IFN- γ betrifft (178, 179).

Auch 4-1BBL auf DCs beziehungsweise 4-1BB auf T-Zellen gehören zur TNF-Familie. Die Interaktion dieser beiden Moleküle führt zu einer forcierten Proliferation von CD8⁺ T-Zellen sowie zu einem Anstieg ihrer IFN- γ Freisetzung. Außerdem trägt sie zu einer vermehrten Zytokinproduktion durch die DCs sowie zu einer verlängerten Halbwertszeit anderer Mitglieder der TNF-Familie bei, in diesem Falle von RANK (receptor activator of NF κ B) auf DCs beziehungsweise RANK-L (RANK-Ligand) auf T-Zellen (180).

Es gibt natürlich noch zahlreiche weitere Mitglieder der TNF-Familie, auf die jedoch im Einzelnen nicht genauer eingegangen werden soll.

2.9.3 Weitere kostimulatorische Moleküle

Schließlich wurde noch eine recht heterogene Gruppe von DC-T-Zell-Interaktionen regulierenden Rezeptoren beschrieben.

Die Interaktion zwischen LFA- (Leukozytenfunktions-Antigen-)1 und ICAM- (interzelluläres Adhäsionsmolekül-)1 beispielsweise induziert eine adhäsive Bindung zwischen DC und T-Zelle. Wird diese Bindung zerstört, kommt es als Folge zu einer merklich geringeren Proliferation der betroffenen T-Lymphozyten (181, 182). Unter Umständen wird durch die Interaktion auch der Ausgang der durch die T-Zellen verursachten Immunantwort beeinflusst. Stimuliert man nämlich die T-Zellen spezieller Mäuse, die einen für das Ovalbumin-(OVA-)Peptid 323-339 spezifischen TCR aufweisen, mit OVA-Peptid auf aus der Milz stammenden DCs, so führen die Interaktionen zwischen LFA-1 und ICAM-1 oder auch ICAM-2 zur Ausbildung einer Th1-Antwort. Wird die Bindung jedoch durch eine Kombination aus anti-ICAM-1 und anti-ICAM-2 blockiert, kommt es zumindest *in vitro* zu einer Th2-Antwort (183).

Vor wenigen Jahren wurde schließlich das Molekül DC-SIGN charakterisiert (DC-spezifisches, ICAM-3 aufgreifendes Nicht-Integrin). Es handelt sich dabei um ein 44-kDa großes Membranprotein vom Typ1 mit einer extrazytoplasmatischen Mannose-bindenden Lektindomäne vom Ca⁺⁺-haltigen C-Typ (184). Es wird vermutet, dass die Bindung zwischen DC-SIGN auf DCs und ICAM-3 auf T-Zellen notwendig ist, um eine effiziente Interaktion zwischen dem MHC II:Antigenpeptid-Komplex auf den DCs und dem TCR zu ermöglichen (185). Die Bindung zwischen DC-SIGN und seinem Liganden soll dabei für eine ausreichende Adhäsion zwischen DC und T-Zelle sorgen, so dass gegenseitig Signale übermittelt werden können.

Ein weiterer Ligand für DC-SIGN ist ICAM-2. Die Interaktion der beiden Moleküle scheint eine Rolle für die Migration der DCs durch Endothelien zu spielen, wobei sowohl ruhende als auch aktivierte Endothelien passiert werden können (186).

2.10 T-Zell-Gedächtnis, -Effektorfunktion und -Toleranz

DCs regulieren die primäre Immunantwort indem sie entweder zum Tod der AG-spezifischen T-Zellen führen oder indem sie T-Zell-Toleranz, -Effektorfunktion oder -Gedächtnis induzieren. Zusätzlich wird durch die Synthese verschiedener Zytokine die Art der Effektor-T-Zelle beeinflusst, also ob es sich letztendlich um eine proinflammatorische Th1- oder um eine regulatorische Th2-Zelle handelt.

Es existiert ein Model, nach dem die Differenzierung der T-Zellen direkt mit der Länge der Interaktion zwischen DC und T-Zelle in den lymphatischen Organen korreliert ist (187). Demnach differenzieren nur die potentesten T-Lymphozyten, welche eine lange Bindung an die DCs aufrechterhalten können, in Gedächtnis-T-Zellen. Zur Ausbildung von Effektorfunktionen soll sogar eine noch längere Interaktion von Nöten sein. Liegt eine ungenügende Stimulation vor, bedingt durch eine schlechte Kompatibilität zwischen dem TCR und dem MHC:Antigenpeptid-Komplex und/oder durch eine ungenügende Kostimulation, würde dies nach diesem Model zu Anergie oder Apoptose führen. Fällt die Stärke der Stimulation dagegen ungefähr zwischen der für die Induktion der Anergie und der für die Differenzierung in Effektor-T-Zellen benötigten Intensität, entsteht eine weitere Form der Gedächtnis-T-Zelle, nämlich die so genannte zentrale Gedächtnis-T-Zelle (188). Beide Formen der Gedächtniszellen haben eine Lebenserwartung von mehreren Jahren und können rasch auf von APCs präsentierte AG reagieren. Dabei zirkulieren die zentralen Gedächtnis-T-Zellen zwischen Blut und lymphatischen Organen, während die „peripheren“ Gedächtnis-T-Zellen zwischen Blut und peripheren Geweben zirkulieren. Erstere reagieren auf präsentierte AG durch weitere Expansion und Differenzierung in Effektor-T-Zellen, um anschließend in die betroffenen Gebiete einzuwandern, während die anderen Gedächtniszellen, auch bedingt durch ihre Lokalisation, umgehend auf präsentierte AG reagieren können (188).

2.10.1 Bildung von Gedächtniszellen

Analog zu den Effektor-T-Zellen kann man auch bei den Gedächtnis-T-Zellen zwischen einer CD4⁺ und einer CD8⁺ Population unterscheiden.

Die Persistenz der CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen ist dabei unabhängig vom Vorhandensein von AG (189). Vielmehr scheint dafür das Gleichgewicht zwischen IL-15 und IL-2 eine Bedeutung zu haben (190). So setzen DCs IL-15 frei (191-193), was zum Überleben der CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen beitragen könnte. Letztendlich weiß man jedoch noch sehr wenig über die Rolle, welche die DCs hinsichtlich der Persistenz dieser Zellen spielen.

Ähnlich verhält es sich bei den CD4⁺ Gedächtnis-T-Zellen. Es ist jedoch immerhin bekannt, dass die Verarbeitung und das Präsentieren von AG durch DCs unverzichtbare Bestandteile der Mechanismen sind, die zum Überleben der CD4⁺ Gedächtnis-T-Zellen beitragen (194). Die Quelle des AG scheinen dabei AG:AK-Komplexe auf FDCs zu sein. Die Entwicklung der FDCs wird dabei wiederum durch B-Zellen unterstützt, die auch für die Produktion der Komplex-bildenden AK verantwortlich sind und somit ebenfalls erheblich zur Entwicklung des T-Zell-Gedächtnisses beitragen.

2.10.2 Bildung von Effektorzellen

Wie bereits erwähnt ist für die Differenzierung von Effektorzellen aus naiven T-Zellen sowohl ein sehr langer Kontakt zwischen dem TCR und dem MHC II:Antigenpeptid-Komplex als auch eine ausreichende Kostimulation erforderlich (187, 195).

Da die Expression besagter Komplexe bei DCs für über 100 Stunden bestehen bleibt (196), stellen diese Zellen optimale Bedingungen für eine effektive Stimulation her. Den T-Zellen deren TCR die höchste Affinität zu dem präsentierten AG aufweist, gelingt es dann auch am ehesten eine lange Interaktion aufrechtzuerhalten, um anschließend durch eine rasche Abfolge zahlreicher Mitosen eine große Anzahl an genetisch identischen Tochterzellen zu generieren, welche dann wiederum zu Effektor-T-Zellen differenzieren.

Die Freisetzung von IL-12 durch die DCs fördert dabei, wie bereits beschrieben, die Bildung von Th1-Zellen (197), ist jedoch nach Langenkamp auf die relativ kurze Zeitspanne von acht bis zwölf Stunden begrenzt (126). Danach werden die proliferierenden T-Zellen entweder in Richtung Th2-Zelle oder in Richtung regulatorische T-Zelle (Tr) polarisiert.

Interessanterweise wird dabei für die Stimulation der Th1-Subpopulation eine kürzere Interaktion zwischen DC und T-Zelle benötigt als für die Stimulation der Th2-Subpopulation erforderlich ist. Die Ursache dafür liegt in der zusätzlichen Zeit die nötig ist, um die IL-4 und IL-13 kodierenden Gene zu demethylieren, was für die Bildung von Th2-Zellen unerlässlich ist (198).

Die meisten Pathogene induzieren die Bildung und Freisetzung von IL-12. Einige wenige Faktoren bewirken jedoch die Hemmung der Synthese oder Freisetzung dieses Zytokins, so

zum Beispiel Prostaglandin E₂ (PGE₂) (199-201), IL-10 (202) und manche Mikroben wie bestimmte Formen von *Candida albicans* (203).

Damit eine große Anzahl der in den lymphatischen Organen lokalisierten T-Zellen zu Th1-Zellen differenzieren, bedarf es jedoch aufgrund der beschränkten IL-12 Freisetzung durch die DCs eines permanenten Einstroms frischer, IL-12 produzierender DCs aus den peripheren Gebieten. Auch die Expression von CD40L durch aktivierte, AG-spezifische T-Zellen kann die IL-12 Sekretion der DCs fördern, wobei dieses Signal für sich alleine noch nicht ausreichend ist. Eine vorherige Aktivierung der DCs durch einen mikrobiellen Stimulus ist dafür essentiell (204, 205). Sobald die Infektion ausheilt und damit der mikrobielle Stimulus wegfällt, verlieren die DCs auch ihre Fähigkeit IL-12 zu produzieren.

In der Abwesenheit von IL-12 fördert die Freisetzung geringer Mengen an IL-4 durch korrespondierender T-Zellen über eine autokrine Stimulation die Entwicklung von Th2-Zellen.

2.10.3 Toleranz

Unter Toleranz versteht man die Unfähigkeit des Organismus auf ein spezielles AG zu reagieren. Dabei wird zwischen den zentralen Toleranzmechanismen auf der einen sowie den peripheren Toleranzmechanismen auf der anderen Seite differenziert.

2.10.3.1 Zentrale Toleranzmechanismen

Die zentralen Toleranzmechanismen sind auf die primären lymphatischen Organe, also auf Thymus und Knochenmark beschränkt. Die Nomenklatur der Lymphozyten bezieht sich dabei auf die Lokalisation ihrer Reifung. So werden die im Thymus selektierten Lymphozyten als T-Zellen, die im Knochenmark bzw. beim Vogel in der Bursa selektierten Lymphozyten dagegen als B-Zellen bezeichnet.

T-Lymphozyten die im Thymus eine hohe Affinität zu Autopeptid-präsentierenden DCs aufweisen werden apoptotisch. Dieser Vorgang wird auch als negative Selektion bezeichnet. Zur negativen Selektion können sowohl die Thymus-DCs als auch die peripheren epithelialen Thymuszellen beitragen (206-208).

Bei der positiven Selektion dagegen überleben diejenigen T-Zellen, welche mit nur geringer Affinität auf Autopeptide reagieren. Es kommt zur Abwanderung dieser Zellen in Richtung Kortex, wo sie nun in der Thymusperipherie auf im Zusammenhang mit Auto-MHC-Molekülen präsentierte AG reagieren können. Für die Präsentation dieser AG sind wiederum epitheliale Thymuszellen verantwortlich.

2.10.3.2 Periphere Toleranzmechanismen

Diese Mechanismen umfassen den Tod, die Anergie oder die aktive Suppression von T-Lymphozyten. Aufgrund der zentralen Toleranz ist es T-Zellen normalerweise nicht möglich, auf präsentierte Autopeptide zu reagieren. Falls es dennoch zu einer Interaktion mit einem präsentierten Auto-AG kommt, bei der der TCR aber nur geringe Mengen an MHC:Peptid-Komplex erkennt, nur eine geringe Affinität zu seinem Liganden hat oder von der präsentierenden DC keinerlei kostimulatorische Signale empfängt, führt dies zu Anergie respektive Apoptose. *In vitro* können solche anergischen T-Zellen die Entwicklung einer Immunantwort sogar direkt unterdrücken, indem sie die Expression von MHC II, CD80 und CD86 auf den DCs unterbinden (209).

Aber auch durch die Induktion von regulatorischen T-Zellen (Trs) kann Toleranz erreicht werden. Diese Zellen setzen suppressive Faktoren frei und unterdrücken somit sowohl die Funktion als auch die Entwicklung von Th1- und Th2-Zellen aus so genannten Th0-Zellen. Vermutlich werden die Trs anfänglich durch DCs stimuliert (210, 211). Neben Trs welche sich durch die Bildung der suppressiven Zytokine IL-10 und/oder TGF- β auszeichnen, gibt es auch solche die über direkte Zell-Zell-Interaktionen wirken.

Grundsätzlich kommt es immer dann zur Bildung von Trs, wenn es in Anwesenheit hoher IL-10 Spiegel zu einer wiederholten Aktivierung von T-Zellen kommt (212), wobei die Quelle des IL-10 zum Beispiel DCs sein können.

2.11 Rolle der DCs in Bezug auf die B-Zell-Funktion

Der Schwerpunkt der meisten Studien die sich mit DCs beschäftigen liegt in der Aktivierung naiver T-Lymphozyten. DCs spielen jedoch auch hinsichtlich der Stimulation von B-Lymphozyten eine essentielle Rolle und zwar sowohl in den T-Zell-Bereichen lymphatischer Organe als auch in den germinalen Zentren (GC) (180, 213).

Eine indirekte aber nichts desto Trotz entscheidende Rolle kommt den DCs dabei deshalb zu, weil sie T-Zellen zur verstärkten Produktion von CD40L sowie von B-Zell-Hilfsfaktoren anregen. Interdigitierende DCs in den parakortikalen Bereichen des Lymphknotens sind sogar in der Lage direkt mit den durch CD40L aktivierten naiven B-Zellen zu interagieren, was diese über einen noch nicht exakt definierten Mechanismus zur Proliferation anregt (213).

Außerdem tragen durch CD40 aktivierte DCs über die Produktion von IL-12 zur Differenzierung von B-Zellen in IgM-sezernierende Plasmazellen bei (214, 215). Die Differenzierung der Plasmazellen wird dabei durch die Bildung der löslichen IL-6R α -Kette

(sgp80) erleichtert. Dieses Molekül bildet zuerst einen Komplex mit IL-6, um anschließend an den IL-6 Rezeptor der B-Lymphozyten zu binden und diesen somit zu vervollständigen (215). Außerdem regen DCs durch CD40L aktivierte B-Zellen zum Isotyp-Wechsel an. Auch können sie AG im nativen Zustand an B-Zellen präsentieren und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* einen Wechsel von IgM zu IgG induzieren (216).

Auf die FDCs und ihre Funktion im Zusammenhang mit der B-Zell-Funktion wurde im Kapitel 2.5.3.1 bereits ausführlich eingegangen.

2.12 Dendritische Zellen in der klinischen Anwendung

In den vergangenen Jahren sind DCs insbesondere hinsichtlich ihrer Rolle als entscheidendes Adjuvanz für Impfstoffe gegen mikrobielle Infektionen untersucht worden. Aber auch die Verhinderung der Transplantatabstoßung, die Therapie von Krebs, Autoimmunkrankheiten oder allergischen Reaktionen werden zunehmend als mögliche Ziele für die klinische Anwendung von DCs erkannt.

2.12.1 Dendritische Zellen als Impfadjuvanz

Aktuelle Vakkzine schließen in Adjuvanzen emulgierte Toxoide, rekombinante Proteine und Peptide sowie vollständig inaktivierte oder abgeschwächte mikrobielle Bestandteile ein. Für zahlreiche Infektionen gibt es jedoch noch keine ausreichend schützende, vorbeugende Impfung. Auch fehlt noch eine Strategie, um eine protektive Immunität gegen die persistierende Infestation von Keimen zu erzielen. So stellen Infektionen mit den intrazellulären Pathogenen *Mycobacterium tuberculosis* oder *Leishmania donovani* immer noch ein weltweites Problem dar, da es in einigen Fällen trotz optimaler Therapie zu einem progressiven Krankheitsverlauf kommen kann.

Durch eine gezielte Manipulation von DCs könnte es jedoch gelingen, in solchen Fällen die Immunabwehr des Wirtes zu stimulieren und die Infektion zu besiegen (217-219). So könnte durch für mikrobielle AG oder Zytokine kodierende DNA-Fragmente in den Vakkzinen die Reifung von DCs oder auch die Bildung von IL-12 unterstützt werden, was wiederum eine Th1-Antwort induzieren würde. Bezeichnet wird eine solche Strategie als so genannte genetische Impfung. Bei dieser speziellen Form der Vakkzination wird ein mikrobielle Gene enthaltendes DNA-Stück verwendet. Die Zellen des Empfängers nehmen die geimpften Gene auf und exprimieren sie. Sind DCs darunter werden die entstehenden Proteine über den klassischen endogenen Weg mit Hilfe von MHC I-Molekülen präsentiert. Aber auch jede

andere transfizierte Zelle ist in der Lage das mikrobielle Protein zu präsentieren und ermöglicht daher den DCs und anderen dazu befähigten Zellen zum einen die Kreuzpräsentation der Peptide über MHC I-Moleküle, zum anderen aber auch den endosomalen Weg der Präsentation über MHC II-Moleküle.

Es gibt diverse Studien, die die Möglichkeit einer solchen Vakkzination bestätigen. So führte die intradermale Injektion eines durch den Zytomegalievirus- (CMV-)Promotor gesteuerten Plasmids, das für ein AG-Protein kodiert, tatsächlich zur Sensibilisierung gegenüber dem entsprechenden Protein. Auch die Beteiligung kutaner DCs konnte mit dieser Studie bestätigt werden. Dazu wurden drei Tage nach der Injektion des Plasmids Hautproben entnommen und die daraus migrierenden DCs isoliert und untersucht. Wie erwartet enthielten sie für das AG kodierende mRNA und waren außerdem in der Lage, sowohl $CD4^+$ T-Zellen zu aktivieren als auch die Bildung von CTLs zu induzieren. Dies wird als eindeutiger Hinweis dafür gesehen, dass zumindest die in der Haut lokalisierten DCs dazu imstande sind, im Zuge einer genetischen Vakkzination gleichermaßen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen zu mobilisieren (220).

2.12.2 Dendritische Zellen und Transplantation

DCs spielen eine wesentliche Rolle hinsichtlich der Induktion der Transplantatabstoßung. Sie sind es die letztendlich bestimmen, ob es zu einer akuten Abstoßung des Transplantats kommt oder ob die Operation erfolgreich verläuft (221-223).

In den routinemäßig transplantierten Organen wie Herz, Niere, Leber oder Haut befinden sich immer auch unreife DCs des Spenders (224-226). Gleichzeitig findet man immer auch Empfänger-DCs in den Transplantaten, die diese im Zuge der nach einer solchen Operation unvermeidlich auftretenden Entzündungsreaktion infiltrieren. Sowohl Spender- als auch Empfänger-DCs haben dabei Einfluss auf den Ausgang der Transplantation (221-223).

Die Spender-DCs verlassen das transplantierte Organ um zu den Lymphknoten zu wandern, wo sie ihre allogeenen MHC-Moleküle den T-Zellen des Empfängers präsentieren (223, 224, 227). Da zahlreiche allospezifische T-Zellen auf die Komplexe aus Spenderpeptid und Spender-MHC-Molekül reagieren, kommt es dementsprechend auch zu einer starken Vermehrung dieser T-Zellen.

Empfänger-DCs wiederum beeinflussen den Ausgang der Transplantation, indem sie in das betroffene Organ einwandern, dort AG des Spenders aufnehmen und verarbeiten und die entstehenden Peptide anschließend ebenfalls den Empfänger-T-Zellen präsentieren. Damit wird den T-Zellen in diesem Fall jedoch nur ein begrenztes Repertoire immundominanter allogener Peptide präsentiert, da als AG-Quelle vermutlich nur apoptotische und/oder

nekrotische Zellen in Frage kommen (228). Die Präsentation kann dabei sowohl über MHC I-Moleküle (Kreuzpräsentation) als auch über MHC II-Moleküle erfolgen.

Zu einer akuten Abstoßungsreaktion kommt es immer dann, wenn die T-Zellen des Empfängers auf die allogenen AG des Spenders mit einer starken spezifischen Immunantwort reagieren. Nur mit T-Zellen, die eine Toleranz gegenüber diesen AG entwickeln, hat das Transplantat langfristig eine gute Überlebenschance (229).

Ein Hauptziel der Forschung stellt es daher momentan dar, die Eigenschaften Toleranz erzeugender DCs für Transplantationszwecke nutzbar zu machen. Es wurden in dieser Richtung bereits verschiedene Versuche unternommen. Beispielsweise ist es gelungen durch die Kostimulation unterdrückende Moleküle wie anti-CD40L oder CTLA4Ig unreife DCs zu regulieren oder *ex vivo* vom Spender stammende Vorläufer-DCs durch die Behandlung mit TGF- β dahingehend zu manipulieren, dass sie ebenfalls kostimulatorische Defizite aufweisen. Auch konnten Spender-DCs genetisch so verändert werden, dass sie immunregulatorische Zytokine wie z.B. TGF- β oder IL-10, mit der Kostimulation interferierende Moleküle wie CTLA4Ig, CD40Ig oder CTLA4L oder AICD (activation-induced cell death) induzierende Liganden wie FasL exprimieren (230-232).

Der AICD scheint dabei eine Komponente der Toleranz alloreaktiver T-Zellen darzustellen (233-235) und wird vermutlich von DCs eingeleitet, da diese Mitglieder der TNF-Familie wie TRAIL oder den Liganden für den Apoptoserezeptor Fas exprimieren, von denen bekannt ist, dass sie Apoptose induzieren (232, 236). Die betroffenen T-Zellen sezernieren wiederum große Mengen an IL-10 bevor sie zugrunde gehen, was durch die Hemmung der Bildung von MHC II- und kostimulatorischen Molekülen die Funktion der DCs beeinflussen könnte (237). Von denjenigen T-Zellen die dem AICD nicht zum Opfer fallen wird vermutet, dass sie zu Trs differenzieren und eine ungewöhnliche Kombination verschiedener Zytokine freisetzen, einschließlich IL-10 und IFN- γ (212, 235).

Zumindest *in vitro* ist es außerdem gelungen, durch die Kultivierung von aus dem Knochenmark stammenden DCs mit Cyclosporin A eine DC-Population mit herabgesetzter Stimulationsaktivität zu generieren (238). Die Ursache für diese reduzierte Fähigkeit auf Alloantigene adäquat zu reagieren liegt in der Wirkung des Cyclosporins, welches die nukleare Translokation des Transkriptionsaktivators NF κ B (nuclear factor-kappa B) blockiert. NF κ B ist wiederum für die Kontrolle von Genen verantwortlich, die für MHC- und kostimulatorische Moleküle kodieren.

Alle diese Studien deuten darauf hin, dass es durchaus möglich ist die allogene Stimulationsfähigkeit von Spender-DCs zu verringern. In wie weit man sich dies auch

therapeutisch zu Nutzen machen kann, um die Halbwertszeit allogener Transplantate zu verlängern, bleibt jedoch abzuwarten.

Neben den akuten Abstoßungsreaktionen die auch als host-versus-graft Immunreaktion bezeichnet werden, existiert noch eine zweite Komplikation, die so genannte GVHD (graft-versus-host disease). Auch diese Krankheit wird durch DCs verursacht. Sie kann bei allogenen Knochenmarkstransplantationen auftreten und wird dadurch hervorgerufen, dass auch im Knochenmark neben naiven Lymphozyten geringe Mengen an Effektor-T-Zellen vorhanden sind. Im Falle einer Knochenmarkstransplantation besteht deshalb die Möglichkeit, dass von APCs des Empfängers präsentierte Autoantigene von Effektor-T-Zellen des Spenders als fremd erkannt werden (239, 240). Vorbeugend werden deshalb die T-Zellen des Spenders *in vitro* aus dem Transplantat entfernt und der Empfänger einer prophylaktischen Immunsuppression unterzogen (241, 242).

2.12.3 Dendritische Zellen in der Krebstherapie

Die Ergebnisse verschiedener Studien an Versuchstieren sowie die ersten klinischen Erprobungen am Menschen bestätigen das enorme Potential, welches die DCs hinsichtlich der Induktion von Immunantworten aufweisen, und lassen auch auf ein entscheidendes therapeutisches Potential schließen. Doch obwohl diese ersten Versuche durchaus viel versprechend ausfielen, sollte man sich darüber im klaren sein, dass sie auf Grund der zum Teil erheblichen Unterschiede in der Qualität der DCs und des Versuchsaufbaus und -monitorings sowie den unterschiedlichen Patientenpopulationen kaum vergleichbar sind (243).

2.12.3.1 Induktion natürlicher Killerzellen

Mehrere neuere Studien deuten darauf hin, dass insbesondere von Monozyten abstammende DCs von großem Nutzen sein könnten, um ruhende natürliche Killerzellen (NK) (244) bzw. natürliche T-Killerzellen (NKT) (245) zu aktivieren und damit vom angeborenen Immunsystem zusätzliche Hilfe in der Abwehr von Tumorzellen zu erhalten. Diese angeborenen Waffen der Immunabwehr sind unter Umständen wichtig, um Widerstand gegen bösartige Tumoren leisten zu können.

2.12.3.2 Immunität gegen das gesamte Antigenrepertoire des Tumors

Um mit Hilfe von DCs eine verbesserte *in situ* Vakzination zu erreichen wird es notwendig sein, mehr über die Beladung der DCs mit AG und über ihre Reifungsmechanismen

herauszufinden. Insbesondere die Wirkungsweise von Wachstumsfaktoren wie z.B. Flt3L, Chemokinen, DC-spezifischen Oberflächenmolekülen, DC-spezifischen Promotoren und Reifungsstimuli spielt dabei eine große Rolle, da nur mit einem entsprechend großen Wissen darüber die Zahl der DCs *in situ* erhöht werden und ihre AG-Expression, Reifung und Migration gesteuert werden kann. Beispielsweise gibt es Hinweise darauf, dass durch eine verbesserte Beladung der DCs mit Exosomen deren Effizienz stark erhöht werden könnte (246). Bei diesen Exosomen handelt es sich um kleine, sezernierte Membranvesikel endogenen Ursprungs, die sowohl als AG-Quelle als auch zum AG-Transport dienen können. Bei Mäusen gibt es ein interessantes Beispiel für die gezielte Beladung von Rezeptoren, nämlich die Beladung des DEC205 Rezeptors mit AG, um *in vivo* entweder direkt Immunität oder Toleranz zu induzieren, wobei zum Teil auch zusätzliche Reifungsstimuli eingesetzt wurden (247).

Das Ziel all dieser Bemühungen liegt letztendlich darin, durch die gezielte Migration von DCs und T-Zellen in Tumore eine Immunität zu erzielen, die gegen das gesamte AG-Repertoire dieser Tumore gerichtet ist.

2.12.3.3 Adaptive Immuntherapie

Dass DCs *in vitro* äußerst effektiv tumorspezifische T-Zellen zur Expansion anregen können steht ebenso fest wie die Tatsache, dass man sich diese rasch teilende Population von CTLs bei speziellen Krebsformen für die adaptive Immuntherapie zu Nutze machen kann (248). Da es nun auch möglich ist, DCs sowohl mit definierten als auch mit undefinierten Tumor-AG zu beladen, könnte der adaptive Transfer solcher zytotoxischer T-Zellen wesentlich zielgerichteter und auch besser durchführbar werden. Insbesondere nach „rückenmarksschonenden“ Chemotherapien scheint eine solche Therapie äußerst gut anzuschlagen (249).

2.12.4 DCs in der Therapie von Immun-vermittelten Krankheiten

Da die dendritischen Zellen essentiell für die Induktion primärer Immunantworten sind, spielen sie auch eine entscheidende Rolle was die Auslösung und die Aufrechterhaltung von Immun-vermittelten Krankheiten betrifft. In diesem Zusammenhang unterscheidet man die durch exogene AG, also Allergene, verursachten Allergien von den durch endogene AG verursachten Autoimmunkrankheiten. In beiden Fällen handelt es sich jedoch um Immun-vermittelte Hypersensibilitätskrankheiten.

2.12.4.1 Allergie

2.12.4.1.1 Asthma

Asthma ist ein klassisches Beispiel für eine Allergie, also für eine durch ein exogenes Allergen verursachte Hypersensibilitätskrankheit. Es handelt sich in diesem Fall um eine Th2-vermittelte Krankheit, deren klinischen Symptome vor allem durch IgE-Antikörper und Zytokine vom Typ 2 verursacht werden.

In experimentellen Tiermodellen dieser Krankheit sind die DCs dabei nicht nur für die Induktion der primären Immunantwort, sondern auch für deren Intensität verantwortlich (250-252). Da Asthma eine Erkrankung der Atemwege ist, sind in diesem Zusammenhang natürlich insbesondere die in den Lungen lokalisierten DCs von Bedeutung. Sie finden sich inner- und unterhalb des Epithels der luftleitenden Strukturen, in den Alveolarsepten, in dem das die Lungengefäße umgebenden Bindegewebe sowie innerhalb der Kapillaren des Lungenparenchyms (253). Dabei repräsentieren die DCs in den Epithelien einen unreifen Typus und weisen eine sehr geringe Halbwertszeit auf (254, 255), während die DCs der Alveolarsepten und des Bindegewebes einen wesentlich reiferen Phänotyp aufweisen (256). Bei den in den Kapillaren des Parenchyms lokalisierten DCs schließlich handelt es sich um Vorläuferzellen (257). Masten und Lipscomb postulieren, dass in der murinen Lunge $CD8\alpha^- CD11c^+ CD11b^+$ DCs den häufigsten Phänotyp repräsentieren (258).

Die Aufgabe der Lungen-DCs besteht darin, auf infektiöse Agentien mit der Induktion einer Th1-Antwort zu reagieren sowie gegenüber harmlosen Allergenen die Bildung von Toleranz zu ermöglichen. Solange keine entzündlichen Veränderungen vorliegen bleiben die DCs in einem relativ unreifen Zustand, und eine nur geringe Anzahl von ihnen migriert konstitutiv zu den regionalen Lymphknoten, wo es entweder zur Anergie oder zur Deletion der reagierenden T-Zellen oder zu einer schwach ausgeprägten Th2-Antwort kommt (259). Liegt jedoch eine Entzündung vor oder trifft ein anderes Gefahr signalisierendes Ereignis ein, reifen die DCs und migrieren in größerer Anzahl zu den Lymphknoten, um $CD4^+$ T-Zellen zur klonalen Expansion und Differenzierung anzuregen. Die meisten Infektionen führen dabei zur Bildung von IL-12 sezernierenden DCs und damit zur Ausbildung einer Th1-Antwort.

Warum es jedoch bei einzelnen Individuen zu einer massiven Th2-Antwort und zur Entwicklung von Asthma kommt, ist letztendlich noch nicht ganz klar, obwohl verschiedene Theorien existieren. So sollen bestimmte Umweltgifte oder Infektionen, zum Beispiel die Infektion mit RSV (respiratorisches Synzytialvirus) (260, 261) zur Freisetzung von PGE_2 , IL-10 oder TGF- β durch Lungen-DCs führen. Diese Substanzen veranlassen unreife DCs

zwar zur Reifung, befähigen sie jedoch nicht dazu IL-12 bilden zu können. Die AG-präsentierenden DCs die daraufhin die Lymphknoten erreichen, führen daher mit höherer Wahrscheinlichkeit zu einer Th2- als zu einer Th1-Antwort.

Bei an Asthma erkrankten Individuen ist die Anzahl der Lungen-DCs dabei grundsätzlich stark erhöht (262, 263), wobei aber nicht bekannt ist ob sich diese DCs phänotypisch und/oder funktionell von denen gesunder Individuen unterscheiden. Bei Behandlung mit Glukokortikoiden kommt es zu einer signifikanten Reduktion der DCs bis zu einem Niveau, das ungefähr dem Normalzustand gesunder Individuen (*steady-state*) entspricht. Dies bestätigt wiederum die Theorie, dass die große Menge an DCs in den Luftwegen von Asthmatikern eine nicht unwesentliche Rolle hinsichtlich der Persistenz der chronischen T-Zell-medierten allergischen Entzündung spielt. Haben sich erst einmal Allergen-spezifische Th2-Gedächtniszellen gebildet, wäre es durchaus möglich, dass diese durch die wiederholte Präsentation des Allergens durch die Lungen-DCs permanent stimuliert werden. Es wird außerdem vermutet, dass es auf diese Weise zu einer Verschlimmerung akuter Asthmaanfälle sowie zur Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung kommt, durch die diese Krankheit charakterisiert ist.

2.12.4.2 Autoimmunkrankheit

2.12.4.2.1 Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis

Die EAE (experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis) repräsentiert, im Unterschied zur Allergie die durch ein exogenes Allergen verursacht wird, eine durch ein endogenes AG entstandene Krankheit. Hervorgerufen wird sie durch Immunisierung mit einem Myelin-spezifischen Protein. Mit Ausnahme des zentralen Nervensystems (ZNS) ist die Menge an MHC II:Myelinprotein-Komplexen äußerst gering. Da T-Lymphozyten unter physiologischen Bedingungen jedoch nicht ins ZNS vordringen, verharren die für das betreffende Protein spezifischen Zellen deshalb in einem Zustand, der als immunologische Ignoranz bezeichnet wird. Mit Hilfe von AG-präsentierenden DCs kommt es jedoch nach der Vakkzination zur Aktivierung dieser T-Lymphozyten, die mit der Sekretion von IFN- γ reagieren. IFN- γ wiederum führt zur Rekrutierung von Makrophagen, die ihrerseits TNF- α freisetzen. Beide Zytokine spielen eine elementare Rolle bei entzündlichen Prozessen im Bereich des ZNS. Auch das Chemokin MIP-3 α wird im ZNS im Verlauf der EAE hochreguliert, um weitere DCs und Lymphozyten anzulocken, analog zu seinem Rezeptor CCR6 (264).

Damit es letztendlich zur Ausbildung der EAE kommt, müssen die AG-spezifischen T-Zellen das AG aber auch auf APCs im ZNS erkennen. Dazu ist wiederum eine verstärkte Expression von MHC II-Molekülen durch diese APCs notwendig. Um die entsprechenden Gene zu aktivieren bedarf es des so genannten CIITA (Klasse II Transaktivator). Mit Hilfe dieses Moleküls konnten Suter et al. die wichtige Rolle der DCs hinsichtlich der Induktion der EAE bestätigen, da im ZNS der Versuchstiere nur die DC-spezifische Form des CIITA, nicht aber die B-Zell-spezifische Form nachgewiesen werden konnte (265).

Es existieren auch Studien die die Rekrutierung von DCs in das ZNS in der Effektorphase der EAE belegen (264). Dabei wurden im Rückenmark immunisierter Mäuse DEC205⁺ CD11⁺ Zellen mit dendritischer Form nachgewiesen. Auch wurden sowohl während der akuten als auch während chronischer und rezidivierender Phasen der Krankheit DCs in den entzündlichen Infiltraten des ZNS gefunden, die sich durch eine hohe Dichte an MHC II- und an kostimulatorischen Molekülen auf ihrer Oberfläche auszeichneten.

2.12.4.2.2 Immuntherapie der EAE

Für die Behandlung von Autoimmunkrankheiten ist eine auf DCs basierende, die konventionelle Therapie unterstützende Immuntherapie vorgeschlagen worden (266).

Huang et al. konnten in einem Rattenmodell die Entwicklung der EAE verhindern, indem den Tieren vor der Immunisierung subkutan aus dem Knochenmark stammende DCs injiziert wurden, die vorher wiederum mit einem Peptid des enzephalitogenen MBP (Myelin-Basis-Protein) in Kontakt gebracht worden waren (267). Die Toleranz wurde dabei mit einer erhöhten Expression von iNOS (induzierbare Stickoxid Synthase), einer vermehrten Bildung von NO (Stickstoffmonoxid) und einer größeren Menge apoptotischer Zellen in den T-Zell-Bereichen der Lymphknoten in Verbindung gebracht (268).

2.13 Aviäre dendritische Zellen

Obwohl die Entdeckung der Funktion der Bursa fabricii durch Glick et al. Mitte des letzten Jahrhunderts großes Aufsehen erregt hat (269) und das Huhn eine Zeit lang als *das* immunologische Modell zur Differenzierung zwischen B-Zell- und T-Zell-vermittelter Immunität angesehen wurde, erlosch das Interesse für das Immunsystem des Vogels recht bald und mit der Maus als Tiermodell rückte das Immunsystem des Mammaliens in den Vordergrund.

Doch gerade in letzter Zeit, nicht zuletzt durch die rasche, pandemieartige Ausbreitung des auch für den Menschen potentiell gefährlichen Vogelgrippe-Virus H5N1, hat das Interesse für das aviäre Immunsystem wieder neuen Auftrieb erfahren.

Dabei unterscheidet sich das Immunsystem des Vogels erheblich von dem des Säugers, was sich besonders deutlich im Fehlen organisierter Lymphknoten bemerkbar macht. Man muss sich deshalb immer darüber bewusst sein, dass beide Systeme absolut nicht vergleichbar sind und dass deshalb die Ergebnisse von mit Mammaliern durchgeführten Studien keinesfalls auf den Vogel übertragen werden können. Dass dabei gerade über die aviären DCs so wenig bekannt ist, liegt neben dem oben erwähnten zeitweisen Desinteresse im Wesentlichen daran, dass keine spezifisch gegen Vogel- bzw. Hühner-DCs gerichtete AK vorhanden sind. So gelingt die Identifikation aviärer LCs lediglich durch die Kombination von gegen MHC II und ATPase gerichteten AK sowie den Nachweis der für LCs spezifischen Birbeck Granula (BG), während die Spezifität des mAk CVI-ChNL-74.3 für aviäre FDCs bzw. des polyklonalen, gegen das bovine S-100 Protein gerichteten AK für aviäre DCs rein auf morphologischen und topographischen Kriterien beruht. Auch die für eine *in vitro* Kultivierung aviärer DCs benötigten Zytokine sind nicht erhältlich, mit Ausnahme von IL-3, IL-4 und GM-CSF, welche vor kurzem kloniert werden konnten (270).

2.13.1 Langerhans Zellen

Die Langerhans Zellen stellen nicht nur beim Säugetier sondern auch beim Vogel die am besten untersuchte DC-Population dar. Bereits vor 15 Jahren wurden Langerhans-ähnliche Zellen zuerst beim Ochsenfrosch (271), dann auch bei verschiedenen Vogelarten wie Huhn, Truthuhn, Wachtel und Reisfink nachgewiesen. Es handelt sich dabei um in der Epidermis lokalisierte Zellen, die auf ultrastruktureller Ebene mit den LCs der Mammalier identisch sind (272, 273). Immunhistochemisch konnte bei diesen Zellen sowohl beim Huhn (274) als auch beim Frosch (275) eine völlige Übereinstimmung hinsichtlich der Expression der relevanten LC-Marker MHC II und ATPase (Adenosintriphosphatase) mit den epidermalen DCs des Mammaliars gezeigt werden. Der Nachweis der LC-spezifischen BG schließlich gelang erstmals beim Truthuhn (276), während die Identifikation dieses hochspezifischen Markers beim Huhn noch einige Jahre mehr in Anspruch genommen hat (277).

2.13.2 Dendritische Zellen

Während Hühner-LCs also immerhin noch durch die Kombination von gegen MHC II-Moleküle und ATPase gerichteten AK mit hoher Sicherheit erkannt werden können,

ist die Detektion anderer DC-Populationen schon wesentlich schwieriger. Der polyklonale, gegen das bovine S-100 Protein gerichtete AK scheint hierbei jedoch recht hilfreich zu sein. Beim S-100 Protein handelt es sich um ein Ca^{++} -bindendes Protein (278), dessen exakte biologische Funktion noch nicht eindeutig feststeht. Ursprünglich glaubte man, dass es sich um ein für neuroektodermale Gewebe spezifisches Protein handelt, welches hauptsächlich in Gliazellen lokalisiert ist (278, 279). Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass S-100 Protein bei verschiedenen Vertebraten einschließlich des Menschen auch in LCs (280), in interdigitierenden Retikulumzellen, in Lymphknoten (281, 282) sowie in FDCs (283, 284) vorkommt. Diese Tatsache veranlasste schließlich Gallego et al. dazu, die Eignung des Proteins als Marker für Hühner-DCs zu untersuchen (285). Tatsächlich fanden sie in allen untersuchten lymphatischen Geweben S-100⁺ Zellen mit dendritischem Aussehen, so in der Milz, den Caecaltonsillen, den Peyer'schen Platten, der Harder'schen Drüse und der Bursa fabricii. Die Zellen waren dabei in den Bereichen lokalisiert, in denen bereits DCs vermutet worden waren, also in der Medulla der Bursafollikel (286), in den GCs (287) sowie in den T-Zell-Bereichen (288) (289). Interessant war dabei auch die Tatsache, dass 100% der untersuchten Bursen und Milzen S-100⁺ Zellen aufwiesen, während es bei den anderen Organen deutlich weniger waren. Gallego et al. vermuten, dass dies mit der Funktion der aviären DCs als Antigen-präsentierende Zellen zu tun haben könnte (Gallego et al., 1989). Im Zuge von Reifung und AG-Präsentation wäre eine Konformationsänderung des S-100 Proteins denkbar, durch welche die für die Erkennung des Proteins durch den AK notwendigen Epitope für diesen erst zugänglich werden.

2.13.3 Follikuläre dendritische Zellen

Anfang der 90er Jahre entwickelten Jeurissen et al. durch Immunisierung von Mäusen mit Stromazellen aus der Hühnermilz den mAK CVI-ChNL-74.3. Dieser AK erkennt hochspezifisch bestimmte Zellen in den GCs sowie kleine Aggregate von Stromazellen in den T-Zell-Arealen lymphatischer Organe (290). Die Form dieser Zellen entspricht der Form der FDCs der Mammalier und auch die Tatsache, dass 72 Stunden nach intravenöser Applikation von AG dieses AG in Form von Immunkomplexen auf CVI-ChNL-74.3⁺ Zellen in germinalen Zentren anzutreffen ist, legt den Schluss nahe, dass es sich tatsächlich um zu den FDCs der Säuger homologe Zellen handelt.

In weitergehenden Studien wurde die Lokalisation von neu gebildeten Immunkomplexen im Zuge einer AK-Reaktion untersucht. Sowohl die Lokalisation der gebildeten AK als auch die des assoziierten AG stimmten nicht exakt mit der Lage der CVI-ChNL-74.3⁺ Zellen überein,

es lag jedoch eine starke Korrelation mit den entsprechenden Zellkörpern vor (291). Offensichtlich ist also das vom mAK CVI-ChNL-74.3 erkannte AG nicht mit den Immunkomplexen assoziiert. Ob es sich aber bei den CVI-ChNL-74.3⁺ Zellen in den T-Zell-Bereichen tatsächlich um FDC-Vorläufer oder vielleicht doch um eine völlig andere Zellpopulation handelt, muss erst noch untersucht werden.

3 ZIELSETZUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Morphologie und Verteilung der aviären myeloiden Zellen *in situ* am Beispiel des Haushuhns (*Gallus gallus f. domestica*) zu untersuchen. Beim Mammalier finden die für die spezifische Abwehr essentiellen Interaktionen zwischen den Lymphozyten und den myeloiden, Antigen-präsentierenden Zellen in den Lymphknoten statt. Da Vögel jedoch keine Lymphknoten besitzen, die denen der Säugetiere in Struktur und Funktion vergleichbar wären, stellt sich die Frage welches Organ bzw. welche Organe bei den Vögeln diese Aufgabe übernehmen. Das Wissen um die Lokalisation und die Kompartimentierung der myeloiden Zellen im Gewebe ist also von elementarer Bedeutung für das Verständnis der Immunabwehr beim Vogel. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die äußere Haut (Integumentum commune), die Bursa fabricii/cloacalis sowie die Lunge (Pulmo) als Referenzorgane gewählt.

Die Haut bot sich deshalb an, weil sie als großflächiges Organ den Organismus von seiner äußeren Umwelt abgrenzt und damit als erste Barriere gegen potentielle Pathogene fungiert. Da die Haut an den verschiedenen topographisch-anatomischen Lokalisationen auch eine unterschiedliche Histomorphologie aufweist, wurden verschiedene Areale gewählt um einerseits einen repräsentativeren Querschnitt zu ermöglichen und um andererseits potentielle Unterschiede besser darstellen zu können. So wurde einmal die befiederte Haut am Beispiel der sehr dünnen, fragilen Brust-, Flügel- und Halshaut mit der unbefiederten Haut verglichen, sowie die unbefiederte Haut der Hautanhangsgebilde am Beispiel der Kehllappen (Paleae) mit der unbefiederten, beschuppten Haut der Ständer (Podotheca).

Die Bursa fabricii ist aus immunologischer Sicht schon deshalb hochinteressant, weil sie als primäres lymphatisches Organ das Homolog zum Knochenmark der Säuger und damit die Prägungsstätte der B-Lymphozyten darstellt. Weil sie über einen Kanal direkt mit dem Proctodaeum und damit mit dem Gastrointestinaltrakt kommuniziert, kommt dieses Organ außerdem mit Pathogenen in Kontakt, welche über die Nahrung aufgenommen worden sind. Aus diesem Grund eignet sich auch die Bursa für die oben genannte Fragestellung, da durch besagte Pathogene nicht nur Lymphozyten beeinflusst, sondern insbesondere auch Zellen der myeloiden Linie angelockt und/oder aktiviert werden könnten.

Die Lunge schließlich ist ein komplexes und gegenüber Krankheitserregern äußerst empfindliches Organ. Viele Pathogene nutzen sie als Eintrittspforte in den Organismus. Auf mechanische Weise wird das Eindringen dieser Mikroorganismen durch ein zilientrageendes Epithel erschwert. Beim Vogel befindet sich ein solches Epithel über die gesamte Länge der

Trachea und des Primärbronchus sowie in den Anfangsabschnitten der Sekundärbronchen. An den Abgängen der caudalen Sekundärbronchen findet man auch so genanntes BALT (Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe). Es ist anzunehmen dass dieses Gewebe, ähnlich wie beim Säugetier, einen Abwehrmechanismus auf zellulärer Ebene darstellt. Letztendlich ist aber über die Funktion des aviären BALT noch sehr wenig bekannt. Fundierte Einblicke in die Funktion dieses Organs innerhalb der Immunabwehr des Vogels wird man jedoch nur gewinnen können, wenn bekannt ist welche (myeloiden) Zellen in welchen Kompartimenten der Lunge (ko-)lokalisiert sind.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Material

4.1.1 Tiere und Tierhaltung

Für die Organentnahme zur Anfertigung der histologischen Schnitte wurden Hühner der Linien M11 und LSL verwendet. Die entsprechenden Eier wurden vom Institut für Tierzucht in Mariensee (M11) bzw. vom Gut Heinrichsruh in Berglern (LSL) bezogen und anschließend unter Standardbedingungen ausgebrütet. Die Haltung der adulten Tiere erfolgte in kleineren Gruppen in Volieren mit Stroheinstreu und Sitzstangen, ihre Ernährung bestand aus handelsüblichem Alleinfutter sowie Wasser ad libitum.

4.1.2 Geräte in alphabetischer Reihenfolge

| | |
|---|--|
| Digitale Kamera (DFC 320) | Leica Camera AG, Solms, Deutschland |
| Lichtmikroskop (DMR) | Leica Camera AG, Solms, Deutschland |
| Magnetrührer (IKAMAG[®]RET) | Janke & Kunkel GMBH & CO.KG, Staufen i. Br., Deutschland |
| Mikrotom-Kryostat (HM500 OM) | Microm, Walldorf, Deutschland |
| Paraffin-Ausgießstation (AP 280) | Microm, Walldorf, Deutschland |
| pH-Meter (Φ32 pH Meter) | Beckman, Fullerton, Kalifornien, USA |
| Rotationsmikrotom (HM360) | Microm, Walldorf, Deutschland |
| Schüttler (IKA[®] Stone-Shaker) | Janke & Kunkel GMBH & CO.KG, Staufen i. Br., Deutschland |
| Tiefkühltruhe (GFL) | Bavaria Kälte- und Klimatechnik GmbH, Ismaning, Deutschland |
| Wärmeschrank | Memmert, Schwabach, Deutschland |

4.1.3 Chemikalien in alphabetischer Reihenfolge

| | |
|--|--|
| Aceton | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat (Na₂HPO₄x2H₂O) | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Essigsäure | Roth, Karlsruhe, Deutschland |

| | |
|--|---|
| Ethanol 70%ig | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Ethanol 96%ig | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Eosin-Y | Richard Allen Scientific, Kalamazoo, MI, USA, bezogen über Microm, Walldorf, Deutschland |
| Formaldehyd | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Isopropanol | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Hematoxylin I | Richard Allen Scientific, Kalamazoo, MI, USA, bezogen über Microm, Walldorf, Deutschland |
| Kaliumchlorid (KCl) | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Kaliumhydrogenphosphat (KH₂PO₄) | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Methylbutanol | VWR, Darmstadt, Deutschland |
| Natriumchlorid (NaCl) | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Natronlauge (NaOH) | VWR, Darmstadt, Deutschland |
| Paraffin (Typ 1, 3, 6 und 9) | Richard Allen Scientific, Kalamazoo, MI, USA, bezogen über Microm, Walldorf, Deutschland |
| Pikrinsäure | Fluka, Buchs, Schweiz |
| Salzsäure (HCl) | VWR, Darmstadt, Deutschland |
| Stickstoff (flüssig) | Air Liquide Deutschland GmbH, Oberhausen, Deutschland |
| Tris (Trizma-Base) | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Xylol | Roth, Karlsruhe, Deutschland |

4.1.4 Lösungen und Reagenzien in alphabetischer Reihenfolge

Albumin Fraktion V (pH 7,0) AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Bouin'sche Lösung

- 150 ml gesättigte wässrige Pikrinsäure
- 50 ml phosphatgepuffertes Formaldehyd
- 10 ml Eisessig (100%ige Essigsäure)

Eukitt[®] Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,
Deutschland

Phosphatgepuffertes Formaldehyd

162 ml Formaldehyd (37%ig)

ad 1000 ml PBS

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,2

8,0 g Natriumchlorid (NaCl)

1,45 g Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

0,2 g Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)

0,2 g Kaliumchlorid (KCl)

ad 1000 ml Aqua dest.

1 n Natronlauge (NaOH) bzw Salzsäure (HCl), um pH-Wert einzustellen

Roti[®]garose (low melt)

Roth, Karlsruhe, Deutschland

SigmaFast[™] 3,3-Diaminobenzidine

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,

Tablet Sets

Deutschland

Tris-HCl-Puffer (0,05 mol/l, pH 7,6)

6,06 g Tris

ad. 1000 ml Aqua dest.

Salzsäure (HCl) bzw. Tris, um pH-Wert einzustellen

StreptABCComplex/HRP

DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

Tissue-Tek[®] O.C.T.[™]Compound

Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande

4.1.5 Antikörper

4.1.5.1 Primärantikörper

| Klonname | Antigen | Zellpopulation | Zitat |
|---------------|-------------------------|---|--|
| 16-6 | CD45 | Alle hämatopoetischen Zellen | persönliche Mitteilung Prof. Dr. Göbel |
| KUL01 | unbekannt | Monozyten, Makrophagen, interdigitierende DCs, aktivierte Mikrogliazellen | (292) |
| 2G11 | MHC II | Zellen der lymphatischen und der myeloiden Linie | persönliche Mitteilung Prof. Dr. Hala |
| LD42 | MHC II | Zellen der lymphatischen und der myeloiden Linie | (293) |
| 3-6 | β_2 -Integrin? | (Makrophagen) | persönliche Mitteilung Prof. Dr. Göbel |
| CVI-ChNL 68.1 | unbekannt | Monozyten, Makrophagen, interdigitierende DCs | (294) |
| CVI-ChNL 74.2 | unbekannt | Reife Gewebsmakrophagen | (290) |
| CVI-ChNL 74.3 | unbekannt | Follikuläre DCs | (290) |
| TCR-1 | TCR $\gamma\delta$ | γ/δ T-Zellen | (295) |
| TCR-2 | TCR $\alpha/\nu\beta 1$ | α/β T-Zellen | (296) |

Tabelle 4-1: Antikörperspezifität und Quelle.

4.1.5.1.1 Verdünnung der Primärantikörper

Bei allen Primärantikörpern handelte es sich um in der Maus generierte monoklonale Antikörper. Die jeweiligen Zellkulturüberstände wurden für die immunhistologischen Untersuchungen mit PBS verdünnt. Die optimale Verdünnung variierte je nach Organ und verwendetem Antikörper und musste daher in Vorversuchen ermittelt werden. Die Ergebnisse wurden in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

| | Haut | Bursa | Lunge |
|---------------|--------|--------|--------|
| 16-6 | 1:500 | 1:100 | 1:1200 |
| KUL01 | 1:50 | 1:50 | 1:100 |
| 2G11 | 1:1200 | 1:500 | |
| LD42 | | | 1:250 |
| 3-6 | 1:2 | 1:2 | 1:5 |
| CVI-ChNL 68.1 | 1:2000 | 1:2000 | 1:2000 |
| CVI-ChNL 74.2 | 1:200 | 1:200 | 1:200 |
| CVI-ChNL 74.3 | 1:200 | 1:200 | 1:200 |
| TCR-1 | 1:100 | | |
| TCR-2 | 1:100 | | |

Tabelle 4-2: Organabhängige Verdünnung der Primärantikörper.

4.1.5.2 Sekundärantikörper

Biotinylated Anti-Mouse IgG (H+L) Vector Laboratories, Burlingame, Kanada

4.1.6 Sonstiges Material in alphabetischer Reihenfolge

Ausgieß-Rahmen Thermo Electron Corporation, Pittsburgh, PA, USA, bezogen über Shandon, Frankfurt am Main, Deutschland

Deckgläschen Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden-Schierstein, Deutschland

Einfrierbox NeoLab, Heidelberg, Deutschland

Einmalspritze (20 ml) Henke Sass Wolf GmbH, Tuttlingen, Deutschland

Feuchte Kammer Eigene Fertigung

Injektionskanüle (0,90 x 40 mm) NeoLab, Heidelberg, Deutschland

Markierstift (DAKO Pen) DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

Mikrotomklingen (Typ C35 u. S35) Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan, bezogen über medite GmbH, Burgdorf, Deutschland

Normal Horse Serum (S-2000) Vector Laboratories, Burlingame, Kanada

| | |
|---------------------------------------|--|
| Objektträger | Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden-Schierstein, Deutschland |
| Objektträger (SuperFrost®Plus) | Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden-Schierstein, Deutschland |

4.2 Methoden

4.2.1 Histologie

Für die HE-Färbung wurden neben unfixierten Gefrierschnitten auch Paraffinschnitte fixierter Organe verwendet. Durch die Fixierung kommt es jedoch zur Zerstörung verschiedener Epitope, so dass diese Präparate für die meisten der bei den immunhistologischen Untersuchungen verwendeten Antikörper nicht mehr geeignet sind. Der Strukturhalt ist bei Paraffinschnitten jedoch wesentlich besser als bei Gefrierschnitten, so dass bei ersteren im Allgemeinen eine wesentlich geringere Schnittdicke möglich ist.

Für die immunhistologischen Untersuchungen wurden aus den angeführten Gründen ausschließlich Gefrierschnitte unfixierter Organe verwendet.

4.2.1.1 Organentnahme

4.2.1.1.1 Entnahme der Hautproben

Die Hühner wurden betäubt und direkt im Anschluss durch Ausbluten getötet. Für die Entnahme der Hautproben wurden als stellvertretende Areale für eine extrem dünne, fragile äußere Haut die Brust-, die Flügel- und die Halshaut gewählt, während die Haut der Kehllappen und der Ständer verwendet wurde, um die dickere, widerstandsfähigere Körperdecke zu repräsentieren.

Bevor mit Hilfe einer feinen Pinzette und eines Skalpells die Abtrennung des Integumentum commune vom darunter liegenden subkutanen Bindegewebe erfolgte, wurden eventuell vorhandene Federn entfernt und der betroffene Bereich mit Hilfe von 70%igem Ethanol gereinigt und desinfiziert. Die Größe der entnommenen Hautproben betrug jeweils ca. 5 x 5 mm.

4.2.1.1.2 Entnahme der Bursen

Die Tötung der Hühner erfolge auf dieselbe Weise wie oben beschrieben. Anschließend wurde eine kaudale, partielle Laparotomie durchgeführt, um die dorsal des Coprodaeums gelegene Bursa freipräparieren zu können.

4.2.1.1.3 Entnahme der Lungen

Auch bei der Entnahme der Lungen wurden die Hühner auf dieselbe Weise getötet wie für die Entnahme der Hautproben und der Bursen. Um aber ein Kollabieren des Organs bei der Entnahme zu verhindern, mussten die Lungen *in situ* mit Formalin gefüllt und auf diese Weise fixiert werden. Da eine Fixierung bei den für die immunhistologischen Untersuchungen vorgesehenen Lungen jedoch nicht erwünscht war, erfolgte die Füllung der Organe in diesem Fall mit einer speziellen Agarose. Beide Techniken werden weiter unten genau beschrieben.

Sobald eine ausreichende Fixierung erfolgt bzw. sobald die Agarose geliert war, konnte mit der Präparation begonnen werden. Sofern der Tierkörper nicht bereits, wie für die Applikation der Agarose geschehen, von ventral geöffnet worden und Herz, Leber und Magen-Darm-Trakt entfernt worden waren, wurde dies nachgeholt. Anschließend konnte mit der Entfernung des Brustbeins fortgefahren werden. Dazu mussten zunächst die Rippen auf Höhe der Synchronosis intercostalis durchtrennt werden. Schlüssel- und Rabenschnabelbein wurden ebenfalls durchtrennt, so dass sich das gesamte Brustbein nach dem Durchschneiden der umliegenden Muskulatur abheben ließ. Nun lagen die Lungen frei zugänglich und konnten vorsichtig herauspräpariert werden. Dazu wurden sie zunächst stumpf oder mit Hilfe einer feinen Pinzette vom Septum horizontale sowie vom umliegenden Gewebe separiert. Danach erfolgte die Absetzung von der Trachea im Bereich der Bifurkation durch Scherenschlag. Bei beiden Lungenflügeln wurde anschließend jeweils das vordere Drittel verworfen, da es erfahrungsgemäß kein BALT enthielt, und der verbleibende Rest entlang der Sulci costales in drei ca. 1-1,5 cm dicke Scheiben geschnitten.

4.2.1.2 Haltbarmachen der Organe

4.2.1.2.1 Fixierung der Proben für Paraffinschnitte

4.2.1.2.1.1 Haut- und Bursaproben

Die für die Fixierung und Paraffineinbettung vorgesehenen Haut- und Bursaproben wurden direkt nach der Entnahme in ein mit Bouin'scher Lösung gefülltes Gefäß verbracht. Damit die Fixierlösung das Gewebe besser durchdringen kann, wurde das Gefäß anschließend auf einen Schüttler gestellt, wo es für die nächsten 24 Stunden belassen wurde. Es folgte eine routinemäßige Entwässerung mit Hilfe der aufsteigenden Alkoholreihe:

Ethanol 70%ig (2 x 12 Stunden)

Ethanol 96%ig (2 x 12 Stunden)

Isopropanol (2 x 12 Stunden)

Xylol (1 x 12 Stunden, 1 x 24 Stunden)

Während der gesamten Entwässerungsreihe wurden die Proben auf dem Schüttler belassen. Erst danach erfolgte die „Paraffinierung“, wobei die Proben in einem Wärmeschrank bei 60°C gelagert werden mussten, um eine vorzeitige Verfestigung des Paraffins zu vermeiden.

Paraffin 1 (24 Stunden)

Paraffin 3 (24 Stunden)

Paraffin 6 (24 Stunden)

Paraffin 9 (2 x 24 Stunden)

Die einzelnen Paraffinstufen unterscheiden sich hinsichtlich der Länge ihrer Polymerisationsketten und damit hinsichtlich ihrer Konsistenz. Paraffin 1 besitzt die längsten Ketten und ist damit am instabilsten, während Paraffin 9 die kürzesten Ketten aufweist und damit im ausgehärteten Zustand die höchste Festigkeit erreicht. Die eigentliche Einbettung in spezielle Ausgieß-Rahmen aus Kunststoff wurde schließlich mit Hilfe einer so genannten Paraffin-Ausgießstation durchgeführt.

4.2.1.2.1.2 Lungenproben

Wie bereits erwähnt, mussten die Lungen im Gegensatz zu den Haut- und Bursaproben *in situ* fixiert werden, um ein Kollabieren der Organe zu vermeiden. Als Fixierlösung wurde phosphatgepufferte 6%ige Formaldehydlösung verwendet. Um diese wiederum applizieren zu können, musste zunächst die Pars cervicalis der Trachea freipräpariert und möglichst weit kranial so durchtrennt werden, dass sich die Trachea bis zum Brusteingang abheben ließ. Um eine vollständige Füllung der Lunge mit Formalin zu gewährleisten, wurde das freie Ende der Trachea über das Lungenniveau gehoben. Hierdurch war es möglich, bei vollständiger Füllung des Lungen-Luftsacksystems, den Flüssigkeitsspiegel in der Trachea zu erkennen. Eine stumpf geschliffene Injektionskanüle wurde in die Trachea eingeführt und das verbliebene Lumen der Trachea zum Zweck des Druckausgleichs nicht verschlossen. Auf diese Weise konnten Zerreißen durch Überdruck im Lungengewebe verhindert werden. Mit Hilfe einer Einmalspritze wurde dann die Formalinlösung langsam eingegeben und die Trachea anschließend mit einer Arterienklemme verschlossen. Nach einer einstündigen Fixierung bei Raumtemperatur wurde das Huhn ventral eröffnet und die Lunge, wie bereits

beschrieben, herauspräpariert. Die deutlichen Sulci costales auf der Dorsalfläche der Lunge dienten als Orientierungshilfe, um die Lunge in der Transversalebene in möglichst vergleichbare Scheiben zu schneiden. Diese Scheiben wurden nun in spezielle Ausgieß-Rahmen gelegt und eine weitere Stunde in 6%igem Formaldehyd nachfixiert. Anschließend erfolgte eine einstündige Wässerung der Proben unter fließendem Leitungswasser, um Formalinrückstände auszuwaschen. Die Entwässerung sowie die weitere Vorgehensweise entsprachen derjenigen der Haut- und Bursaprobe.

4.2.1.2.2 Einfrieren der Proben für Gefrierschnitte

4.2.1.2.2.1 Haut- und Bursaprobe

Die Proben wurden sofort nach der Entnahme in mit Tissue-Tek[®] O.C.T. (Optimal Cutting Temperature)[™] Compound gefüllte Ausgieß-Rahmen verbracht. Die spezielle Zusammensetzung und Konsistenz des Tissue-Tek[®] verhindern eine zu schnelle Abkühlung des Gewebes bei der Überführung in flüssigen Stickstoff und tragen somit entscheidend zur Vermeidung von Gefrierartefakten bei. Dieser Effekt wurde noch dadurch verstärkt, dass die Proben unmittelbar vor dem endgültigen Einfrieren mit Hilfe von gefrorenem 2-Methylbutan vorgekühlt wurden. Die Blöcke verblieben bis zum Abschluss der Probennahme im Stickstoff, während die längerfristige Lagerung in einer Gefriertruhe bei -80°C erfolgte. Dabei wurden die Proben zusätzlich durch Umwickeln mit Aluminiumfolie geschützt.

4.2.1.2.2.2 Lungenprobe

Um das Kollabieren der Lungen bei der Entnahme zu verhindern und gleichzeitig das Anfertigen von Gefrierschnitten zu ermöglichen, wurde die von Zengerling etablierte Agarose-Technik angewendet (297). Bei dieser Technik wird die Agarose Roti[®] garose (low melt) der Firma Roth verwendet, da sie erst bei ca. 37°C geliert und dadurch den Einsatz flüssiger Agarose bei Körpertemperatur erlaubt. Hinsichtlich der Konsistenz erwies sich eine 1,5%ige Agaroselösung als am besten geeignet. Um eine solche Lösung herzustellen wurde die pulverförmige Agarose abgewogen, durch Erhitzen in der Mikrowelle mit PBS in Lösung gebracht und danach im Wärmeschrank bei 40°C gelagert.

Die Tötung der Tiere erfolgte wie bereits beschrieben, wobei die anschließende Präparation sehr zügig geschehen musste, um ein zu starkes Abfallen der Körpertemperatur bis zur Applikation der Agarose zu vermeiden. Durch Entfernen der Haut wurde die Trachea in der Pars cervicalis dargestellt. Es folgte die Eröffnung der Trachea proximal eines vorgelegten Ligaturfadens, so dass eine stumpf geschliffene Injektionskanüle in die Inzision eingeführt

werden konnte. Schließlich wurde die ventrale Bauchwand eröffnet, Herz, Leber sowie Magen-Darm-Trakt entfernt und die kaudale Luftsackgruppe eröffnet. Dies war nötig, um einen Druckausgleich bei der Agaroseapplikation zu gewährleisten und um ein schnelleres Abkühlen des Hühnerkörpers und damit auch der Agarose zu ermöglichen. Bei der gesamten Präparation musste darauf geachtet werden den Thorax nicht zu eröffnen, um ein Auslaufen der Agarose aus den Luftsäcken zu vermeiden.

Schließlich wurde der Tierkörper an den Ständern aufgehängt und die Ligatur oberhalb der zuvor eingeführten Injektionskanüle festgezogen. Die Kanüle sowie die Spritzen für die Eingabe der Agarose sollten idealerweise im Wärmeschrank vorgewärmt worden sein. Die eigentliche Applikation erfolgte relativ langsam, um Luftblasen zu vermeiden, und wurde beendet sobald der sichtbare Agarosespiegel das kaudale Lungenende erreicht hatte. Nach Entfernung der Kanüle wurde die Ligatur schnell festgezogen und das Huhn für etwa eine Stunde in den Kühlraum (4°C) verbracht, um das Abkühlen des Tierkörpers sowie der Agarose zu beschleunigen.

Die Präparation erfolgte wie im Kapitel 4.2.1.1.3 beschrieben, die weitere Vorgehensweise beim Einfrieren entsprach derjenigen der Haut- und Bursaprobe.

4.2.1.3 Anfertigung der Schnitte

4.2.1.3.1 Anfertigung von Paraffinschnitten

Die Anfertigung der 3-5 µm dicken Paraffinschnitten erfolgte bei allen Organen mit dem Rotationsmikrotom HM360 der Firma Microm. Dabei betrug die Dicke der Schnitte 3 µm bei den unbefiederten Hautarealen und bei den Bursen, 4 µm bei den Lungen und 5 µm bei den befiederten Hautarealen. Nach dem Strecken der Schnitte im 47°C warmen Wasserbad wurden sie auf Objektträger aufgezogen und anschließend über Nacht im auf 37°C eingestellten Wärmeschrank getrocknet. Die Lagerung bis zum weiteren Gebrauch erfolgte bei Raumtemperatur in speziellen Objektträgerkästen. Erst unmittelbar vor der Verwendung wurden die Präparate für 10 Minuten in Xylol verbracht, um das Paraffin wieder aus dem Gewebe herauszulösen.

4.2.1.3.2 Anfertigung von Gefrierschnitten

Die Anfertigung der 6-9 µm dicken Gefrierschnitte erfolgte bei allen Organen mit dem Mikrotom-Kryostat HM500 OM der Firma Microm. Die Temperatur des Objektisches und der Box wurden je nach Konsistenz und Fettgehalt des zu schneidenden Organs variiert. Das Aufziehen der fertigen Schnitte geschah auf speziell vorbehandelten Objektträgern, so

genannten SuperFrost®Plus Objektträgern. Vor der 10-minütigen Fixierung in 4°C kaltem, 100%igem Aceton wurden die Präparate 10 Minuten lang zum Trocknen bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Lagerung der fixierten Schnitte erfolgte in der Tiefkühltruhe bei -80°C, wobei spezielle, luftdichte Einfrierboxen verwendet wurden.

Bei der Haut wurde unabhängig davon, aus welcher Region die Probe stammte, eine Objektstichtemperatur von -20°C und eine Boxentemperatur von -17°C gewählt. Die Dicke der Schnitte aus dem Bereich der relativ fragilen Brust-, Flügel- und Halshaut betrug 8-9 µm, bei der etwas robusteren Kehllappen- und insbesondere bei der Ständerhaut gelangen auch dünnere Schnitte von 7 µm. Bei diesen Hautproben war es auch möglich, die Schnitte zur Vermeidung von Falten in kaltem, destilliertem Wasser zu strecken, bevor sie auf die Objektträger aufgespannt wurden.

Bei den Bursen erwiesen sich eine Objektstichtemperatur von -14°C und eine Boxentemperatur von -18°C als optimal. Die Schnittdicke bei diesem Organ lag zwischen 6 und 7 µm.

Die Lunge schließlich wurde bei einer Objektstichtemperatur von -15°C und einer Boxentemperatur von -13°C geschnitten. Dabei wurden die Blöcke so eingespannt, dass der Primärbronchus quer geschnitten werden konnte. Mit Hilfe von Probeschnitten folgte nun die Suche nach dem Bronchus-assoziierten lymphatischen Gewebe (BALT). Die Probeschnitte wurden einer Schnellfärbung mit Hematoxylin I unterzogen, um eine bessere Beurteilung des Gewebes und somit eine bessere Orientierung zu ermöglichen. Im Bereich des BALT wurden anschließend Schnitte von 8 µm Dicke angefertigt.

4.2.1.4 Hematoxylin-Eosin-Färbung an Paraffin- und Gefrierschnitten

Zur histologischen Auswertung, die den immunhistologischen Untersuchungen vorausging, wurden jeweils ein Paraffin- und ein Gefrierschnitt pro Tier und Organ mit Hematoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Die Färbungen wurden manuell nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- 1.) Kernfärbung mit Hematoxylin I (10 min)
- 2.) Spülung mit Aqua destillata (Aqua dest.)
- 3.) Bläuen in fließendem Leitungswasser (10 min)
- 4.) Gegenfärbung mit Eosin (max. 3 min)

- 5.) Nochmalige Spülung mit Aqua dest.

- 6.) Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe:
 - Ethanol 70%ig (bis keine Farbwolken mehr abgehen)
 - Ethanol 96%ig (2 min)
 - Isopropanol (2 x 5 min)
 - Xylol (1 x 5 min, 1 x 10 min)

Im Anschluss an die Färbung wurden die Präparate mit Eukitt[®], einem Kunstharz auf Xylolbasis, eingedeckelt und nach 24-stündiger Trocknung lichtmikroskopisch bei 5-, 10-, 20-, 40- und 100-facher Vergrößerung ausgewertet.

4.2.1.5 Immunhistologie an Gefrierschnitten

Die Gefrierschnitte wurden zum Auftauen einige Minuten bei Raumtemperatur gelagert und anschließend 15 Minuten in PBS rehydriert. Um bei der weiteren Manipulation ein Austrocknen zu vermeiden und um die Menge der benötigten Reagenzien zu reduzieren, wurden die Gewebeschnitte auf den Objektträgern mit einem hydrophoben Markierstift eingekreist, bevor sie mit dem so genannten Blocking Serum bedeckt wurden. Dieses Serum dient dazu, unspezifische Bindungen zu reduzieren. Es handelt sich dabei um mit 1% bovinem Serumalbumin (Albumin Fraktion V) und 2,5% Pferdeserum versetztes PBS. Pferdeserum wurde deshalb benötigt, weil der später verwendete Sekundärantikörper im Pferd generiert wurde. Nach einer 30-minütigen Inkubation in der feuchten Kammer wurde das Blocking Serum vorsichtig abgeschüttelt und der Primärantikörper in der für das jeweilige Organ optimalen Verdünnung aufgebracht (siehe Tabelle 4-2). Pro Tier und Organ wurde jeweils ein Schnitt als Negativkontrolle verwendet und dementsprechend anstatt mit einem Primärantikörper nur mit PBS behandelt. Die Inkubation erfolgte entweder 60 Minuten bei Raumtemperatur oder 12 Stunden bei 4°C. Anschließend wurde der Primärantikörper durch Waschen mit PBS entfernt (3 x 5 min).

Da die Primärantikörper ausnahmslos in der Maus gebildet worden sind, musste als Sekundärantikörper ein anti-Maus Antikörper verwendet werden (biotinylated Anti-Mouse IgG). Dieser wurde in einer Konzentration von 7,5 µg/ml PBS mit 1% BSA eingesetzt, und ebenfalls 60 Minuten bei Raumtemperatur oder 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Entfernung des Sekundärantikörpers erfolgte analog zu der des Primärantikörpers durch mehrmaliges, vorsichtiges Waschen mit PBS (3 x 5 min).

Im Anschluss daran wurden die Schnitte mit dem Biotinliganden Streptavidin (StreptABComplex/HRP) beschichtet. Das Streptavidin wurde ca. 30 Minuten vor der Anwendung nach Anweisung des Herstellers in 0,05 mol/l Tris/HCl (pH 7,6) aufgelöst und bis zur Verwendung vor Licht geschützt gelagert. Die Inkubation und das anschließende Waschen erfolgten analog zum Primär- und Sekundärantikörper.

Das für den nächsten Schritt benötigte DAB (3,3-Diaminobenzidin) musste rechtzeitig nach Herstellerangaben in Aqua dest. aufgelöst und bis zur Verwendung vor Licht geschützt gelagert werden. Aufgrund der Stärke der Reaktion erwies sich eine 20-sekündige Beschichtung der Schnitte mit DAB als ausreichend. Durch Überführen der Schnitte in eine mit Leitungswasser gefüllte Küvette wurde die Reaktion gestoppt und die Proben anschließend 10 Minuten lang in Leitungswasser gewässert.

Um die im Leitungswasser enthaltenen Kalziumionen wieder zu entfernen, wurden die Objektträger vor der Kernfärbung mit Hematoxylin in Aqua dest. überführt. Für eine optimale Kernfärbung stellte sich eine Dauer von 30 Sekunden als geeignet heraus. Danach wurde überschüssiger Farbstoff durch zweimaliges, vorsichtiges Waschen in Aqua dest. entfernt und die Proben wiederum 10 Minuten lang in Leitungswasser gewässert. Die enthaltenen Kalziumionen gehen mit dem Hematoxylin eine Komplexbindung ein, welche einen Farbumschlag des Hematoxylins von rot zu blau zur Folge hat. Damit wird bei der mikroskopischen Beurteilung eine bessere Differenzierbarkeit zwischen dem blauen Zellkern und dem, im positiven Fall, braunen Zytoplasma erreicht.

Um die Haltbarkeit der Proben zu erhöhen wurden sie nun mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Dazu wurden sie jeweils 10 Minuten lang in 70%iges bzw. in 96%iges Ethanol, danach zweimal jeweils 5 Minuten lang in Isopropanol und schließlich zweimal jeweils 10 Minuten lang in Xylol überführt.

Das Eindeckeln erfolgte wie bei den Hematoxylin-Eosin gefärbten Schnitten mit Eukitt[®]. Nach einer 24-stündigen Trocknungsphase wurden die Schnitte lichtmikroskopisch bei 5-, 10-, 20-, 40- und 100-facher Vergrößerung ausgewertet.

4.2.1.5.1 Auswertungsverfahren

Bei der lichtmikroskopischen Auswertung der immunhistologisch behandelten Schnitte wurden diese nach der Farbintensität der spezifischen Immunreaktion sowie nach Anzahl, Morphologie und Lokalisation der positiven Zellen beurteilt.

Farbintensität

Als positives, spezifisches Färbeergebnis wurden nur Zellen mit einer mittelstarken bis kräftigen Braunfärbung gewertet.

Anzahl

Die Anzahl der positiven Zellen wurde nach folgendem Schema semiquantitativ beurteilt: negativ (-), vereinzelte Zellen (+/-), wenige Zellen (+), mäßig viele Zellen (++), viele Zellen (+++), sehr viele Zellen (++++)).

Lokalisation

Die Bewertung der Lokalisation der Färbungen in den unterschiedlichen Organen erfolgte in Analogie zu den histomorphologischen Gegebenheiten. Auf diese wird in den einzelnen Kapiteln ausführlich eingegangen.

5 ERGEBNISSE

5.1 HE-Färbung der Haut

Für die histologische Untersuchung der Haut wurden insgesamt fünf M11-Hühner beiderlei Geschlechts im Alter von durchschnittlich 12 Wochen verwendet. Im Mittelpunkt der Untersuchung stand dabei die Beurteilung des Aufbaus des Integumentum commune in Abhängigkeit von der untersuchten Hautregion. Allen Regionen gemeinsam war die grundsätzliche Unterteilung in die Oberhaut (Epidermis) sowie in die darunter liegende Lederhaut (Dermis/Korium), gleichgültig ob es sich um die befiederte Brust-, Flügel- und Halshaut oder um die unbefiederte Haut der Kehllappen und der dorsalen Schuppenhaut des Mittelfußes handelte. In vielen Proben der Kehllappen- und insbesondere der befiederten Haut waren teilweise auch umfangreiche Reste der Unterhaut (Subkutis) vorhanden, während diese bei der Schuppenhaut nur sehr gering ausgeprägt war.

5.1.1 Allgemeine lichtmikroskopische Befunde der Haut

In der Epidermis als einem verhornten Plattenepithel waren verschiedene aus Keratinozyten bestehende Zellschichten zu erkennen. Die Gliederung in diese verschiedenen Zellschichten basiert dabei auf den unterschiedlichen Differenzierungsstadien in denen sich die Keratinozyten befinden und die sich daher neben ihrer Lage auch hinsichtlich ihrer Zellmorphologie unterscheiden (298).

Die unterste Schicht bildete das Stratum basale. Zum Teil wird es auch als Stratum germinativum bezeichnet, da es aus teilungsaktiven Zellen besteht. Die Nomenklatur ist diesbezüglich jedoch etwas irreführend, da manchmal mit dem Begriff „Stratum basale“ auch alle Zelllagen mit Ausnahme der toten Hornzellschicht gemeint sind. Im Folgenden soll daher nur noch die eindeutige Bezeichnung „Stratum basale“ verwendet werden. Die mitotisch aktiven Basalzellen dieser Schicht produzieren permanent Keratinozyten, die im Verlauf der physiologischen Regeneration zur Hautoberfläche wandern. Sie differenzieren dabei aus und werden letztendlich in Form toter Hornschuppen abgeschilfert. Parabasalzellen, Tochterzellen der mitotisch aktiven Basalzellen die nicht in der unmittelbaren Nähe der Basalmembran bleiben, bildeten in allen untersuchten anatomischen Regionen lokal begrenzte, zusätzliche Zellreihen, die in dem betreffenden Bereich aus dem zumeist einreihigen ein mehrreihiges Stratum basale entstehen ließen.

Die sich in Richtung auf die Epidermisoberfläche anschließenden Zellschichten sind das Stratum intermedium und das Stratum transitivum. Diese beiden Schichten wurden in der vorliegenden Arbeit zum Teil zur suprabasalen Zellschicht (Stratum suprabasale) zusammengefasst. Im Stratum transitivum fanden als Folge der einsetzenden Verhornung bereits gravierende Veränderungen statt. So kam es beispielsweise zur Bildung zahlreicher Vakuolen, die den so genannten Übergangszellen ihr charakteristisches Aussehen verliehen.

Die oberflächlichste Schicht der Epidermis wurde von der kernlosen Hornzellschicht, dem Stratum corneum gebildet, welches wie der Name schon andeutet aus toten, verhornten Zellen besteht. Die Dicke der Hornzellschicht variierte zwischen den unterschiedlichen Regionen sehr stark, wobei die befiederten Bereiche das schmalste und die Schuppenhaut der Ständer das breiteste Stratum corneum aufwiesen.

Unterlagert wird die Epidermis vom Korium, die bereits erwähnte Basalmembran trennt beide Areale. Das Korium besteht wiederum aus zwei unterschiedlich beschaffenen bindegewebigen Lagen (299): einmal dem der Basalmembran direkt anliegenden Stratum superficiale sowie weiterhin dem sich in der Tiefe anschließenden Stratum profundum (**Abb. 5-1**).

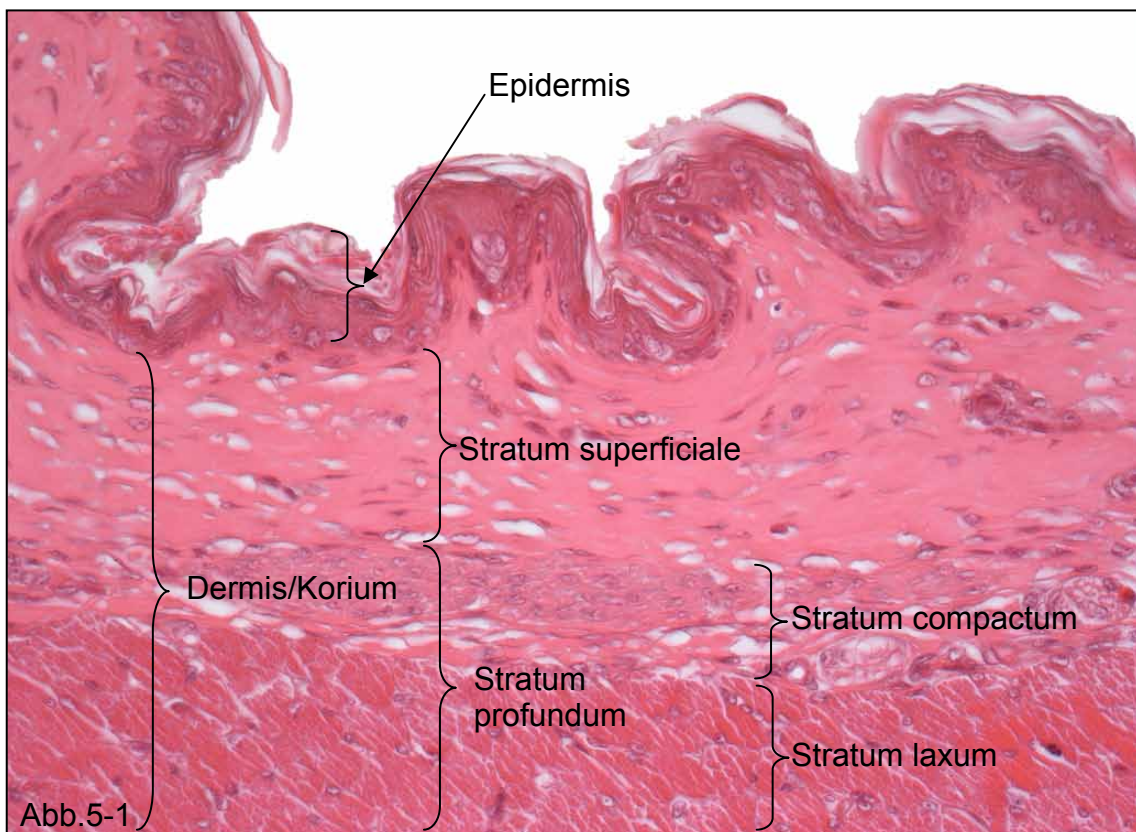


Abb.5-1: Flügelhaut, HE, 40-fach.

Das Stratum superficiale bestand aus einer lockeren Bindegewebsschicht. Da es im Bereich der Federfollikel einen deutlichen Papillarkörper ausbildet, wird es zum Teil auch als Stratum papillare bezeichnet.

Das Stratum profundum dagegen wies eine zweigeteilte Struktur auf: das sich an das Stratum superficiale anschließende Stratum compactum verdankt seinen Namen dem kompakten, straffen Bindegewebe, welches der Lederhaut ihre mechanische Festigkeit verleiht. Im darunter liegenden Stratum laxum dagegen befanden sich glatte Muskelzüge, die teilweise zur Spannung der Haut, teilweise zur Verbindung von Federbälgen dienen (299, 300).

Die durch Faszien begrenzte Unterhaut spielt als Verschiebeschicht sowie als Energiereservoir eine wichtige Rolle (301). Sie enthält daher zahlreiche locker angeordnete Bindegewebsfasern sowie zahlreiche Fettzellen, welche in Form von Fettkörpern (Corpora adiposa) lokal konzentriert sind.

5.1.1.1 Epidermis der befiederten Haut

Da lichtmikroskopisch keine Unterschiede zwischen Brust-, Flügel- und Halshaut festzustellen waren, soll im Folgenden nicht mehr zwischen diesen Arealen differenziert werden. Die befiederte Haut zeichnete sich durch ihre geringe Dicke und extreme Fragilität aus. So maß ihre gesamte Epidermis im Durchschnitt nur etwa 13 μm . Die epidermale Matrix (gesamte Epidermis ohne Stratum corneum) war ca. 9 bis 10 μm dick und bestand aus insgesamt 4 bis 6 Zellreihen.

Das Stratum basale wurde aus einer einzelnen Reihe relativ großer, meist hochprismatischer Zellen gebildet. Diese besaßen einen zentral gelegenen prominenten Zellkern (Nukleus), der einen Großteil des Zellinneren einnahm. Die Kern-Plasma-Relation betrug etwa zwei zu eins. Die drei bis fünf darüber gelegenen Zellreihen bildeten das Stratum suprabasale. Die einzelnen Zellen flachten immer mehr ab, je weiter sie sich der Hautoberfläche näherten, während ihre Breite zunächst zunahm. Die Form der zum Teil schon deutlich pyknotischen Zellkerne entwickelte sich dabei der Zellform entsprechend über rund bis hin zu queroval. Dabei wiesen alle Zellkerne der Epidermis eine gleichermaßen starke Basophilie auf, während das Zellplasma einheitlich eosinophil angefärbt war.

Das kernlose Stratum corneum bestand aus sehr flachen, dachziegelartig angeordneten Zellen, die zur Oberfläche hin hauchdünn wurden. Die genaue Anzahl der Zellreihen des Stratum corneums war auf lichtmikroskopischem Niveau jedoch nicht bestimmbar. Sie färbten sich nur schwach eosinophil an oder blieben völlig ungefärbt.

5.1.1.2 Korium der befiederten Haut

Wie bei der Epidermis konnten auch beim Korium lichtmikroskopisch keine Unterschiede zwischen Brust-, Flügel- und Halshaut festgestellt werden.

Das Stratum superficiale bildete nur unter den Federfollikeln einen deutlichen Papillarkörper aus, ansonsten kam es lediglich zu einer der Oberflächenform der Epidermis angepassten Leisten- und Faltenbildung. Das Stratum compactum wies keinerlei Besonderheiten auf, im Stratum laxum befanden sich, im Vergleich zur unbefiederten Haut, wesentlich mehr Muskelfasern. Erklären lässt sich dies damit, dass die Funktion dieser auch als „echten“ Federmuskeln bezeichneten glatten Muskelzellen in der Regulation der Hautspannung und der Bewegung der Federn liegt (siehe auch Kapitel 5.1.1).

5.1.1.3 Epidermis der unbefiederten Haut

Im Gegensatz zu den verschiedenen Arealen der befiederten Haut wiesen die untersuchten topographischen Bereiche des unbefiederten Integumentum commune teilweise erhebliche Unterschiede auf. Aus diesem Grund werden die jeweiligen Ergebnisse der histologischen Untersuchung getrennt beschrieben.

5.1.1.3.1 Epidermis der dorsalen Schuppenhaut am Mittelfuß

Der allgemeine histologische Aufbau der Epidermis in dieser anatomischen Region entsprach grundsätzlich demjenigen der befiederten Haut. Hauptunterschied war das Vorhandensein der dorsal gelegenen Schuppen (Scutate scales). Diese Schuppen oder Quertafeln entstehen aus einer Epidermisplakode mit nachfolgender Umstrukturierung der darunter liegenden Dermis (302). Sie weisen eine innere und eine äußere Epidermisoberfläche auf, welche durch eine Scharnierregion miteinander verbunden sind (303), wobei der innere Epidermisabschnitt als kontinuierliche Fortsetzung dieser Scharnierregion aufgefasst werden kann (**Abb. 5-2**). Beide Abschnitte setzten sich aus fünf bis sieben Zellreihen zusammen, zusätzlich zu denjenigen des Stratum corneums. Vereinzelt konnten auch Abschnitte mit bis zu elf Zellreihen beobachtet werden.

Auch das Stratum corneum selbst war nicht einheitlich. So waren die Hornzellen der Scutate scales sehr dicht gepackt und spindelförmig angeordnet, die Epidermis zwischen den Schuppen wies jedoch wesentlich lockerer angeordnete Hornlamellen auf. Insgesamt hatte das Stratum corneum der dorsalen Schuppenhaut des Tarsometatarsus mit durchschnittlich 90 µm von allen untersuchten anatomischen Regionen den größten Durchmesser.

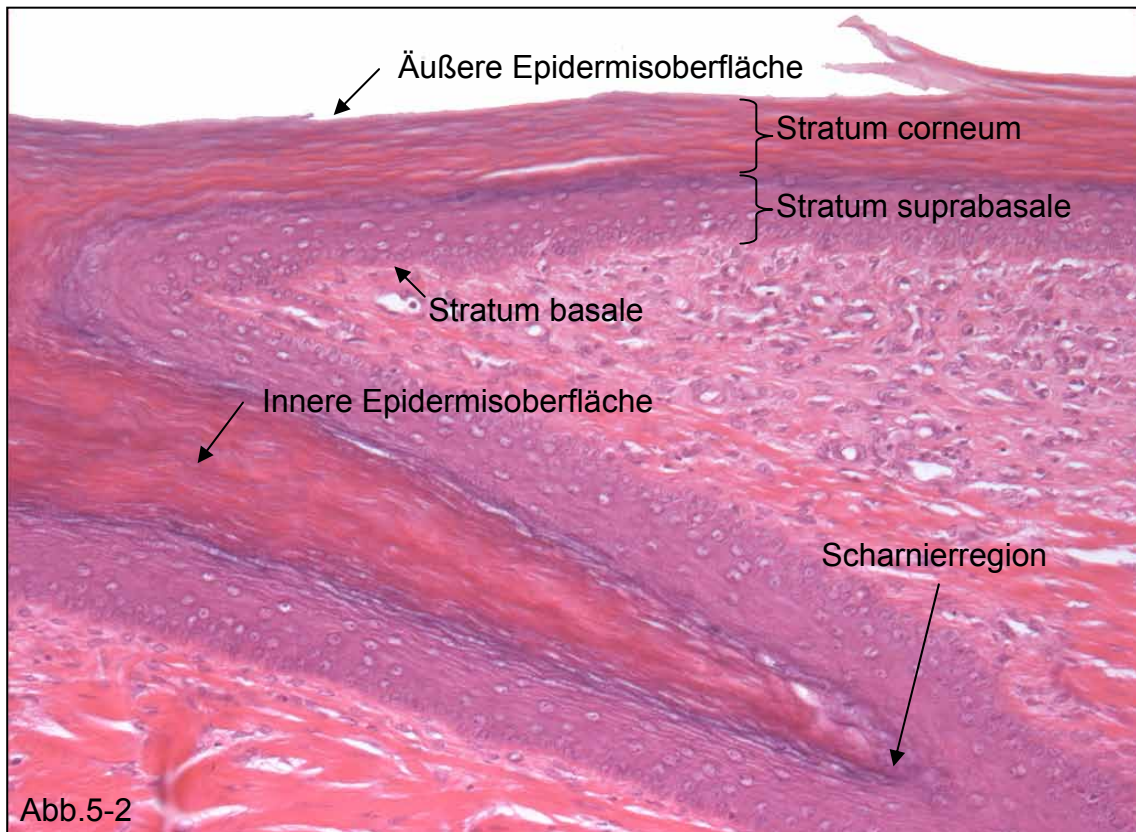


Abb.5-2: Dorsale Schuppenhaut, HE, 40-fach.

5.1.1.3.2 Epidermis der Kehllappen

Auch die Epidermis der Kehllappen folgte dem allgemeinen histologischen Aufbau. Ihr Gesamtdurchmesser nahm mit ca. 70 μm eine Mittelstellung zwischen den dünnen, befiederten Hautarealen und der dicken, stark verhornten Haut der Ständer ein.

Die einreihigen Basalzellen wiesen analog zu den Basalzellen in den anderen untersuchten Regionen eine hochprismatische Form auf. Sie wölbten sich so in das Korium vor, dass dieses einen ausgeprägten Papillarcharakter erhielt. Die Anzahl der Reihen des Stratum suprabasale schwankte bei den untersuchten Tieren zwischen zwei und fünf, beim Stratum corneum konnte die Anzahl der Reihen auf lichtmikroskopischem Niveau jedoch nicht genau bestimmt werden. Es machte mit etwa 20-35 μm knapp ein Drittel bis die Hälfte des Gesamtdurchmessers der Epidermis aus.

5.1.1.4 Korium der unbefiederten Haut

Der Aufbau des Koriums der unbefiederten Haut entsprach im Wesentlichen der allgemeinen Histologie. Auffallend war lediglich der im Vergleich zur befiederten und zur dorsalen Schuppenhaut ausgeprägte Papillarcharakter des Stratum superficiale der Kehllappen.

Außerdem war die Dichte der glatten Muskelzellen im Stratum laxum erwartungsgemäß bei der unbefiederten Haut wesentlich geringer als bei der befiederten Haut, wobei die Schuppenhaut des Tarsometatarsus die geringste Dichte aufwies.

5.1.2 Zusammenfassung

In der folgenden Tabelle wurden die Ergebnisse der histologischen Untersuchung der befiederten und der unbefiederten Haut zusammengefasst.

| | Befiederte Haut | Dorsale Schuppenhaut (Mittelfuß) | Kehllappen |
|------------------------------|--|---|---|
| Epidermis (allgemein) | Dicke (gesamt): ca. 13 µm, Dicke (Matrix): 9-10 µm | Dicke (gesamt): ca. 150 µm, Dicke (Matrix): 30-50 µm | Dicke (gesamt): ca. 70 µm, Dicke (Matrix): 35-50 µm |
| Stratum basale | 1 Reihe hochprismat. Zellen, Kern-Plasma-Relation 2:1 | Analog zur befiederten Haut | Analog zur befiederten Haut |
| Stratum suprabasale | 3-5 Reihen runder bis querovaler Zellen, Kerne zum Teil pyknotisch | 4-6 Reihen, vereinzelt bis zu 10 Reihen, Zellform rundl. bis queroval | 2-5 Reihen runder bis querovaler Zellen, Kerne v.a. dorsal pyknotisch |
| Stratum corneum | Anzahl der Reihen konnte nicht ermittelt werden, insgesamt 3-4 µm dick, sehr flache Zellen ohne Zellkern | Ca. 90 µm dick, kernlose Zellen, im Bereich der Scutate scales dicht gepackt und spindelförmig angeordnet, sonst eher locker verteilt | 20-35 µm dick, sonst analog zur befiederten Haut |
| Stratum superficiale | Papillarcharakter nur im Bereich der Federfollikel, sonst Leisten- und Faltenbildung | Stratum superficiale der Schuppenform der Epidermis angepasst | Ausgeprägter Papillarcharakter |
| Stratum compactum | Dicht angeordnete Bindegewebsfasern | Analog zur befiederten Haut | Analog zur befiederten Haut |
| Stratum laxum | Große Anzahl glatter Muskelzellen | Nur vereinzelt glatte Muskelzellen | Geringe Anzahl glatter Muskelzellen |

Tabelle 5-1: Ergebnisse der histologischen Untersuchung der Haut.

5.2 Immunhistologische Untersuchung der Haut

Für die immunhistologische Untersuchung der Haut wurden insgesamt fünf M11-Hühner beiderlei Geschlechts im Alter von durchschnittlich 12 Wochen verwendet. Zum Teil handelte

es sich bei diesen Tieren um dieselben, die für die histologische Untersuchung verwendet worden sind.

5.2.1 Färbung mit dem mAk 16-6

Das von diesem Antikörper erkannte, auf der Zelloberfläche exprimierte Antigen CD45 wird häufig auch als LCA (leukocyte common antigen) bezeichnet, da es, wie der Name schon sagt, allen Leukozyten zu Eigen ist. CD45 wird deshalb gerne als Marker für hämatopoetische Zellen eingesetzt. Bei unseren Proben diente die Färbung mit dem anti-CD45 Antikörper in erster Linie als Positivkontrolle.

CD45⁺ Zellen konnten sowohl in der befiederten als auch in der unbefiederten Haut in großer Anzahl nachgewiesen werden. Die meisten dieser Zellen befanden sich in der Dermis, wobei sie zwar grundsätzlich alle dermalen Schichten besiedelten (**Abb. 5-8**), das Gros aber in der proximalen Schicht des Stratum superficiale (**Abb. 5-5**) sowie im perivaskulären Bereich angetroffen wurde (**Abb. 5-4**). Lediglich bei der Kehllappenhaut befanden sich wesentlich mehr Zellen in den beiden Schichten des Stratum profundum als im Stratum superficiale. Direkt subepidermal, also in unmittelbarer Nähe der Basalmembran des Stratum basale, war nur eine vergleichsweise geringe Anzahl CD45⁺ Zellen vorhanden, wenn man von einigen wenigen, größeren Zellansammlungen absieht (**Abb. 5-7**).

Interessanterweise wurden epidermale CD45⁺ Zellen lediglich bei aus der dorsalen Schuppenhaut des Mittelfußes stammenden Proben nachgewiesen. Die Epidermis der Kehllappenhaut dagegen war stets negativ und auch in der Oberhaut der befiederten Hautabschnitte wurden keine CD45⁺ Zellen angetroffen. Aufgrund des geringen Durchmessers der Epidermis war das Vorhandensein positiver Zellen im letzteren Fall jedoch deutlich schwieriger zu beurteilen und kann daher nicht zu 100% ausgeschlossen werden. Die wenigen epidermalen CD45⁺ Zellen der Schuppenhaut fanden sich in oder dorsal der Basalzellschicht, oft lokal konzentriert, als meist rundlich-ovale, manchmal dreieckige Zellen von ungefähr 11,25 x 13,75 µm. Der mittelgroße Kern lag exzentrisch im feingranulären Zytoplasma. Auffallend war, dass im jeweils korrespondierenden subepidermalen Dermisabschnitt ebenfalls sehr viele Zellen positiv waren, so dass man zum Teil von regelrechten Aggregaten sprechen konnte.

Grundsätzlich konnten bei den dermalen CD45⁺ Zellen zwei verschiedene Subpopulationen unterschieden werden, die jeweils in großer Anzahl vorhanden waren. Bei der einen der beiden Subpopulationen handelte es sich um ovale, manchmal dreieckige Zellen, die mit durchschnittlich 10,5 x 12,25 µm in derselben Größenordnung wie die soeben beschriebenen

epidermalen Zellen lagen (**Abb. 5-6**). Auch hinsichtlich der anderen morphologischen Kriterien waren beide Populationen vergleichbar. Die zweite Zellart, die in der Dermis angetroffen wurde, wies eine völlig andere Morphologie auf. Die betroffenen Zellen waren lang und schmal, selten breiter als 2,0 μm bei einer Länge von bis zu 14,5 μm . Der Kern war der Zellform angepasst und wurde meist mehr oder weniger peripher im homogenen Zytoplasma angetroffen. Die „Enden“ des Somas wirkten sehr fein und schmal, ob es sich aber tatsächlich um Zytoplasmafortsätze handelte war auf lichtmikroskopischem Niveau nicht eindeutig zu klären. Soweit es beurteilt werden konnte wiesen beide Subpopulationen eine ähnliche Verteilung, eine Tendenz zur Bildung von Aggregaten (**Abb. 5-3**) und eine Affinität zu den perivaskulären Bereichen (**Abb. 5-4**) auf. Bei den direkt subepidermal lokalisierten Zellen handelte es sich jedoch meistens um die schmalen Zellen mit den lang ausgezogenen Enden.

Im Lumen der Gefäße befanden sich ebenfalls einige wenige CD45⁺ Zellen. Sie erfüllten alle morphologischen Kriterien von Lymphozyten: so waren sie von runder Form und mit ca. 7,5 μm im Durchmesser recht klein. Der zentral gelegene Kern nahm mit einer Kern-Plasma-Relation von ca. 2:1 den Großteil des Somas ein, während das Zytoplasma lediglich einen schmalen, perinukleären Ring bildete.

5.2.2 Färbung mit dem mAk KUL01

Bei dem mAk KUL01 handelt es sich um einen Antikörper, der spezifisch Zellen des mononukleären Phagozytosesystems (MPS) des Huhns sowie aktivierte Mikrogliazellen erkennt. Das erkannte Antigen wird dabei auf der Zelloberfläche exprimiert.

Die unbefiederten Hautregionen enthielten keine epidermalen KUL01⁺ Zellen, diese konnten nur in der befiederten Haut in geringer Anzahl nachgewiesen werden. Aufgrund der geringen Dicke der Epidermis und der dichten Aneinanderlagerung der epidermalen KUL01⁺ Zellen war es jedoch nicht möglich, ihre Lage und Morphologie exakt zu bestimmen.

Dermale KUL01⁺ Zellen fanden sich dagegen in allen drei untersuchten Hautregionen in relativ hoher Anzahl. Ähnlich wie bei der Färbung mit dem anti-CD45 Antikörper befanden sich dabei zwar in beiden Schichten der Dermis positive Zellen (**Abb. 5-9 und 5-10**), die meisten von ihnen bevorzugten jedoch das Stratum superficiale bzw. dessen proximalen Bereich. Besonders stark ausgeprägt war die Affinität zum Stratum superficiale in den aus der Schuppenhaut stammenden Proben (**Abb. 5-11**). Die Haut der Kehllappen bildete diesbezüglich jedoch eine Ausnahme: Ebenfalls analog zur Färbung mit dem mAk 16-6

wiesen die positiven Zellen in diesem Fall eine Präferenz für das Stratum profundum auf (**Abb. 5-13**).

Lokalisationen in direkter Nachbarschaft zum Stratum basale konnten ebenfalls, wenn auch nur in geringerer Anzahl, regelmäßig in allen drei Hautregionen beobachtet werden. Die Somata dieser Zellen waren sehr lang und schmal, selten dicker als 2,0 µm bei einer Länge von bis zu 20,0 µm (**Abb. 5-11**). Je nach Ebene des Anschnitts variierte ihre Größe jedoch sehr stark. Ähnlich wie bei den länglichen CD45⁺ Zellen schienen ihre Zellenden von konischer, ausgezogener Form zu sein, so dass man eventuell von Zytoplasmafortsätzen sprechen könnte. Die zweidimensionale Ansicht und die zahlreichen Möglichkeiten der getroffenen Schnittebenen verhinderten jedoch eine exakte Beurteilung der Zellform. Der ebenfalls längliche Zellkern lag manchmal zentral, meistens jedoch exzentrisch im homogenen Zytoplasma. Morphologisch sehr ähnliche Zellen fanden sich auch in den anderen Bereichen der Dermis. Sie waren im Durchschnitt zwar etwas breiter, teilweise bis zu 3,5 µm, ansonsten konnten aber keine nennenswerten Unterschiede festgestellt werden (**Abb. 5-14**). In ähnlich großer Anzahl vertreten waren hier auch rundlich-ovale, manchmal dreieckige Zellen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von ca. 9,0 µm (**Abb. 5-12**). Sie zeichneten sich durch einen rundlichen, exzentrischen Kern mit einer Kern-Plasma-Relation von 1:1,5 bis 1:1 sowie durch granuläres Zytoplasma aus. Obwohl sie ansonsten, abgesehen von den regionalen Unterschieden, alle dermalen Schichten gleichmäßig bevölkerten, wurden sie nie in unmittelbarer Nähe zur Basalmembran angetroffen. Auch Zusammenballungen dermalen positiver Zellen wurden nie beobachtet, eine Präferenz für das perivaskuläre Bindegewebe nur sporadisch.

In der Literatur wurden ebenfalls KUL01⁺ Zellen in der Hühnerhaut beschrieben, wobei jedoch nicht zwischen verschiedenen Subpopulationen differenziert wurde. Es war nur von positiven Zellen mit dendritischer Erscheinung und granulärem Farbmuster die Rede. Diese sollen weiterhin durch die Expression von MHC II-Molekülen gekennzeichnet gewesen sein. Vergleichbar zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit waren diese Zellen sowohl in der Dermis als auch in der Epidermis lokalisiert (292). Leider geht aus dem Artikel nicht hervor, welche anatomischen Hautregionen für den Versuch verwendet wurden.

5.2.3 Färbung mit dem mAK 2G11

Dieser mAk ist, wie auch der mAk LD42, gegen die auf der Zelloberfläche exprimierten MHC II-Moleküle gerichtet. Obwohl beide Antikörper hinsichtlich Spezifität und

Färbeverhalten analog reagieren, soll im Folgenden nur auf den mAk 2G11 Bezug genommen werden.

MHC II⁺ Zellen konnten in allen drei untersuchten anatomischen Regionen jeweils in allen Schichten des Koriums in großer Anzahl detektiert werden. Ähnlich wie bei der Färbung mit dem mAk 16-6 schien sich das Gros der Zellen in der befiederten sowie in der Schuppenhaut dabei im proximalen Abschnitt des Stratum superficiale aufzuhalten (**Abb. 5-15 und 5-18**), während die Zellen in der Kehllappenhaut sich gleichmäßig auf alle dermalen Schichten verteilten. Die Anzahl der MHC II⁺ Zellen schien im Übrigen in der Kehllappenhaut besonders hoch zu sein (**Abb. 5-19**).

Dabei konnte man bei den dermal lokalisierten positiven Zellen, analog zur Färbung mit den mAk 16-6 und KUL01, zwischen zwei etwa gleichgroßen Subpopulationen unterscheiden (**Abb. 5-20**). Die eine bestand aus durchschnittlich 10,25 x 11,5 µm großen Zellen von rundlich-ovaler, manchmal auch dreieckiger Form. Die mittelgroßen Kerne lagen jeweils exzentrisch im feingranulären Zytoplasma. Die zahlreich auftretenden Aggregate und perivaskulären Ansammlungen (**Abb. 5-17**) schienen zum Großteil aus solchen Zellen zu bestehen. Auf Grund der schlechten Differenzierbarkeit der Zellen innerhalb dieser Akkumulationen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sich auch noch weitere Zellarten darin befanden. Die Zellen der zweiten Subpopulation wiederum ähnelten der im Stratum transitivum der Kehllappenepidermis detektierten Zelle, auf die später noch genauer eingegangen werden soll. Sie waren zwar mit durchschnittlich 2,0 x 17,5 µm etwas breiter und nicht ganz so lang, Kernform und -größe, Beschaffenheit des Zytoplasmas sowie die Ausbildung fragiler Ausziehungen waren jedoch identisch. Interessanterweise unterschied sich die Verteilung der Zellen der letzteren Subpopulation innerhalb der untersuchten anatomischen Regionen erheblich. So waren sie in der befiederten Haut relativ gleichmäßig über das Korium verteilt und repräsentierten gleichzeitig in unmittelbarer Nähe der Basalmembran des Stratum basale die vorherrschende Zellart (**Abb. 5-16**). In der unbefiederten Haut dagegen waren sie in diesem Bereich nur äußerst spärlich vertreten, während hier das Stratum profundum eine relativ große Anzahl länglicher MHC II⁺ Zellen zu verzeichnen hatte.

Wie bereits angedeutet konnte eine starke Tendenz zur Bildung von Aggregaten sowie zur Besiedelung des perivaskulären Bindegewebes beobachtet werden. Die Aggregate waren dabei nicht nur auf die zentraleren Abschnitte der Dermis beschränkt, sondern befanden sich zum Teil auch subepidermal, also in direktem Kontakt zur Basalmembran des Stratum basale. Diese Lokalisation konnte insbesondere in den unbefiederten Hautarealen beobachtet werden

(Abb. 5-18). Manchmal konnten proximal der Aggregate epidermale MHC II⁺ Zellen detektiert werden. Dies war zumindest bei aus der dorsalen Schuppenhaut des Mittelfußes sowie, abweichend zum Färbeverhalten des mAk 16-6, bei aus dem Kehllappen stammenden Proben der Fall. Die epidermalen, positiven Zellen befanden sich innerhalb der Basalzellschicht sowie proximal davon im Stratum intermedium, oft lokal konzentriert. In der Epidermis der Kehllappen reichten sie oft bis in die proximalen Bereiche dieser Schicht, während sie bei der Schuppenhaut meist in unmittelbarer Nähe des Stratum basale blieben. Äußerlich ähnelten diese Zellen stark der weiter oben beschriebenen Subpopulation rundlicher Zellen im Korium. Sie lagen mit etwa 11,5 x 12,25 µm in derselben Größenordnung und auch die anderen morphologischen Kriterien waren vergleichbar. Wie bereits erwähnt reagierte in einer der Kehllappenproben auch eine einzelne Zelle im Stratum transitivum äußerst spezifisch. Mit einer Dicke von 1,5 µm und einer Länge von 23,0 µm wich sie morphologisch jedoch erheblich von den übrigen epidermalen MHC II⁺ Zellen ab. Ihr Kern war relativ klein, oval und lag in der Peripherie des homogenen Somas. Bei genauem Hinsehen erkannte man an den „Zellenden“ einige wenige, sehr feine Zytoplasmaausziehungen. Die Epidermis der befiederten Haut dagegen war stets negativ.

5.2.4 Färbung mit dem mAk 3-6

Das korrespondierende Antigen und damit die Bindespezifität dieses Antikörpers sind noch nicht bekannt. Vieles spricht jedoch dafür, dass der mAk 3-6 mit Zellen aus der Linie der Monozyten/Makrophagen interagiert. So soll er in der Durchflusszytometrie die gleichen Populationen wie der mAk 8F2 erkannt haben, bei dessen auf der Zelloberfläche exprimiertem Antigen es sich möglicherweise um ein β_2 -Integrin handelt (304).

Bei Färbung der Proben mit diesem Antikörper reagierten insgesamt relativ wenige Zellen positiv, außerdem konnten entscheidende Unterschiede im Färbeverhalten der verschiedenen untersuchten Areale festgestellt werden.

So fanden sich in der befiederten Haut 3-6⁺ Zellen relativ gleichmäßig über alle dermalen Schichten verteilt, insbesondere aber im subepidermalen Bereich (Abb. 5-21). Sporadisch konnten in letzterer Lokalisation auch kleinere Ansammlungen beobachtet werden. Die Zellen waren im Durchschnitt etwa 2,5 x 19,0 µm groß, teilweise auch deutlich länger. Die exakte Beurteilung der Zellgröße wurde jedoch erheblich durch die Ausbildung feiner, konischer Zytoplasmaausziehungen erschwert. Die ovalen Zellkerne waren von mittlerer Größe und lagen meist exzentrisch im homogenen Zytoplasma. Rundliche Zellen mit einem Durchmesser von ca. 8,75 µm waren in allen dermalen Schichten vertreten. Ihre Anzahl war jedoch

erheblich geringer als diejenige der langen, schmalen Zellen, außerdem wurden sie nie in unmittelbarer Nähe zur Basalmembran gesehen. Ihr Zellkern wies, entsprechend den Zellkernen von Monozyten/Makrophagen, eine Kern-Plasma-Relation von 1:1,5 bis 1:1 und eine exzentrische Lage auf. Das Zytoplasma enthielt jedoch keine Granula, sondern bildete zahlreiche, fragile Ausziehungen. Im Bereich des perivaskulären Bindegewebes fanden sich regelmäßig Zellen von ähnlicher Morphologie (**Abb. 5-22**). Da sie in dieser Lokalisation aber in einer ziemlich hohen Dichte auftraten, konnte keine eindeutige Aussage über das Vorhandensein eventueller Zytoplasmaausläufer gemacht werden. Epidermale 3-6⁺ Zellen konnten in der befiederten Haut in keiner der Proben nachgewiesen werden.

Die unbefiederte Schuppenhaut des Mittelfußes dagegen enthielt positive Zellen nicht nur in allen Schichten der Dermis, sondern auch –wenn auch nur einige wenige- in den basalen Abschnitten der Epidermis. Die betroffenen Zellen waren rundlich und mit ca. 12,5 x 15,0 µm relativ groß. Der mittelgroße Zellkern war oval geformt und lag zentral oder leicht exzentrisch im homogenen Zytoplasma, welches keinerlei Fortsätze erkennen ließ. Subepidermal, in unmittelbarem Kontakt zu den zellhaltigen Epidermisabschnitten, konnten regelmäßig größere Aggregate beobachtet werden (**Abb. 5-23**), insbesondere unterhalb der 3-6⁺, epidermalen Zellen. Auch hier war die Beurteilung der Einzelzelle aufgrund der hohen Zelldichte sehr schwierig, die meisten schienen jedoch sehr stark den rundlichen Zellen der Dermis zu ähneln. Ansammlungen größerer Zellmengen wurden aber nicht nur subepidermal, sondern in allen Schichten der Dermis, bevorzugt im perivaskulären Bereich angetroffen. Analog zur befiederten Haut enthielt auch die Dermis der dorsalen Schuppenhaut eine zweite Zellpopulation (**Abb. 5-24**), die sich durch eine lange, schmale Form des Somas auszeichnete. Vereinzelt wurden diese Zellen auch in den soeben erwähnten Aggregaten angetroffen. Ihre durchschnittliche Größe betrug ungefähr 2,0 x 16,5 µm, die sonstigen morphologischen Kriterien waren ebenfalls mit der entsprechenden Zellpopulation in der befiederten Haut vergleichbar. Anders als diese waren sie aber nicht gleichmäßig in allen dermalen Schichten vertreten, sondern hielten sich bevorzugt im Stratum superficiale auf. Ein direkter Kontakt mit der Basalmembran war dabei äußerst selten.

In den aus der Kehllappenhaut stammenden Proben wurden weder epidermale noch subepidermale Zellen festgestellt. Die in geringer bis mäßig großer Anzahl vorhandenen 3-6⁺ Zellen verteilten sich gleichmäßig über alle Schichten des Koriums, wobei sie Lokalisationen im Stratum compactum zu bevorzugen schienen. Hier bildeten sie regelmäßig kleine, strichförmige Ansammlungen (**Abb. 5-25**). Die Affinität zum perivaskulären Bereich war, verglichen mit derjenigen in den beiden anderen Regionen, nur mäßig ausgeprägt.

Analog zu diesen konnten aber auch in der Dermis der Kehllappen zwei Subpopulationen unterschieden werden. Eine davon wurde wieder von schmalen, länglichen Zellen gebildet, die mit einer durchschnittlichen Größe von $2,5 \times 18,5 \mu\text{m}$ in der Größenordnung der entsprechenden Zellen der befiederten und der Schuppenhaut lagen. Auch Form, Größe und Lage des Kerns sowie Form und Struktur des Zytoplasmas waren vergleichbar. Obwohl die Zellen auch einzeln angetroffen wurden, schienen sie sich bevorzugt zu den bereits erwähnten kleinen Aggregaten zusammenzuschließen. Die zweite Subpopulation, die in erster Linie das Stratum superficiale bevölkerte, schien zahlenmäßig etwas unterlegen zu sein. Morphologisch ähnelten diese Zellen sehr stark den rundlichen Zellen in der Dermis der befiederten Haut (**Abb. 5-26**). Mit einem durchschnittlichen Durchmesser von ca. $9,5 \mu\text{m}$ waren sie zwar geringgradig größer, ihr Zellkern wies mit 1:1,5 bis 1:1 jedoch die gleiche Kern-Plasma-Relation und die gleiche exzentrische Lage auf. Das homogene Zytoplasma bildete ebenfalls zahlreiche Fortsätze. Analog zu den entsprechenden Zellen in der befiederten Haut sahen wir sie nie in direktem Kontakt mit der Basalmembran.

5.2.5 Färbung mit dem mAk CVI-ChNL-68.1

Dieser Antikörper wurde von Jeurissen et al. generiert und ist laut deren Angaben spezifisch für Monozyten, Makrophagen und interdigitierende DCs des Huhns (294). Da er auch in der Durchflusszytometrie eingesetzt werden kann (305), scheint es sich bei dem korrespondierenden Antigen um ein auf der Zelloberfläche exprimiertes Protein zu handeln. Insgesamt interagierten nur mäßig viele Zellen mit dem mAk CVI-ChNL-68.1. Dabei schien die Anzahl der positiven Zellen in der dorsalen Schuppenhaut der Ständer deutlich höher zu sein als in den beiden anderen untersuchten Regionen. Die Zellen besiedelten in diesem Fall zwar alle dermalen Schichten, die Mehrheit befand sich jedoch im proximalen Bereich des Stratum superficiale. Einige von ihnen hatten auch direkten Kontakt zur Basalmembran der Basalzellschicht (**Abb. 5-29**). Ähnlich wie bei der Färbung mit dem anti-CD45 Antikörper formierten sich hier zum Teil regelrechte Aggregate, oberhalb derer es regelmäßig zu Einbrüchen in die Epidermis kam. Die betroffenen Zellen lagen vereinzelt zumeist innerhalb oder direkt über dem Stratum basale. In einer der Proben fand sich eine größere Zellansammlung, die bis in die höheren Schichten der Epidermis reichte. Die Zellen waren mit durchschnittlich $8,75 \times 10,75 \mu\text{m}$ von mittlerer Größe und oval oder unregelmäßig geformt. Ihre ovalen Kerne wiesen eine Kern-Plasma-Relation von 1:1,5 bis 1:1 auf und waren exzentrisch ausgerichtet. Das Zytoplasma hatte stets eine granuläre Struktur.

Bei den subepidermal lokalisierten CVI-ChNL-68.1⁺ Zellen dagegen konnten zwei verschiedene Subpopulationen unterschieden werden. Die eine ähnelte morphologisch den soeben beschriebenen epidermalen Zellen. Die andere, etwas seltener vertretene Subpopulation setzte sich aus langen, schmalen Zellen von ca. 2,5 µm Breite und bis zu 20,0 µm Länge zusammen. Sie hatten einen der Zellform angepassten Zellkern und lang ausgezogene Somaenden, wodurch die exakte Beurteilung von Zellform und -größe jedoch erheblich erschwert wurde. Beide Subpopulationen konnten auch in den tieferen Bereichen der Dermis ausgemacht werden. Dabei wies insbesondere die Erstere eine recht starke Tendenz zur Aggregatbildung sowie eine in allen untersuchten Regionen ausgeprägte Affinität zum perivaskulären Bindegewebe auf. Interessanterweise reagierten die Endothelzellen der Gefäße ebenfalls sehr spezifisch (**Abb. 5-30 und 5-32**). Sie waren mit einem durchschnittlichen Durchmesser von etwa 7,5 µm eher klein und je nach Anschnitt mehr rund oder mehr länglich-oval geformt. Der ovale Kern war mit einer Kern-Plasma-Relation von mindestens 1,5:1 ziemlich prominent.

Wie bereits erwähnt war die Anzahl der positiven Zellen in der befiederten sowie in der Kehllappenhaut wesentlich geringer. Auch hinsichtlich der Verteilung dieser Zellen konnten zum Teil gravierende Unterschiede festgestellt werden. So fanden sich hier im Gegensatz zur Schuppenhaut keinerlei epidermale CVI-ChNL-68.1⁺ Zellen und auch die Anzahl der subepidermalen, in direktem Kontakt mit der Basamembran stehenden Zellen war deutlich kleiner (**Abb. 5-27 und 5-31**). Außerdem handelte es sich in diesem Fall auch nur um eine einzige Subpopulation, nämlich die der schmalen Zellen mit den lang ausgezogenen Zytoplasmaausläufern. In den restlichen Schichten der Dermis dagegen fanden sich wieder beide Subpopulationen. Anders als in der Schuppenhaut lag jedoch keine Präferenz für das Stratum superficiale vor, sondern die Zellen verteilten sich gleichmäßig über alle Schichten, wobei die schmalen Zellen eindeutig in der Überzahl waren. Zellansammlungen fanden sich nur sporadisch und von wesentlich geringerem Ausmaß als in der Schuppenhaut (**Abb. 5-28**), die Affinität zum perivaskulären Bindegewebe war jedoch vergleichbar.

5.2.6 Färbung mit dem mAk CVI-ChNL-74.2

Dieser mAk soll spezifisch eine Subpopulation reifer Gewebemakrophagen erkennen. Da keine durchflusszytometrischen Daten vorliegen, gibt es keine Hinweise darauf, ob es sich bei dem korrespondierenden Antigen um ein intrazelluläres oder um ein auf der Zelloberfläche lokalisiertes Protein handelt. Obwohl der mAk CVI-ChNL-74.2 von Jeurissen et al. als negativ in der Haut beschrieben wurde (290), konnten im Rahmen unserer Untersuchungen

sowohl in der befiederten als auch in der unbefiederten Haut sehr spezifische Färbeergebnisse erzielt werden.

Insgesamt reagierten nur mäßig viele Zellen positiv. In der befiederten Haut waren sie gleichmäßig über die Schichten der Dermis verteilt, ohne jedoch eine Präferenz für eine bestimmte Schicht erkennen zu lassen (**Abb. 5-33**). Auch subepidermal wurden regelmäßig einige Zellen angetroffen, in der Epidermis dagegen nie. Obwohl der mAk CVI-ChNL-74.2 nur mit besagter Makrophagensubpopulation interagieren soll, konnten im Korium, ähnlich wie bei den meisten anderen verwendeten Antikörpern, mehrere morphologisch unterschiedliche Zellarten detektiert werden. Die einen waren lang und dünn und wiesen feine Zytoplasmaausziehungen auf (**Abb. 5-37**). Ihre durchschnittliche Größe betrug $2,5 \times 18,75 \mu\text{m}$, wobei es auch in diesem Fall ein Problem darstellte die exakte Größe des Somas zu bestimmen. Der an die Zellform angepasste mittelgroße Kern lag mehr oder weniger stark exzentrisch im homogenen Zytoplasma. Es waren die einzigen Zellen, die in unmittelbarer Nachbarschaft zur Basalmembran angetroffen wurden, grundsätzlich besiedelten sie aber alle Schichten der Dermis. Ähnlich zu den länglichen, $3-6^+$ Zellen bildeten sie über das Korium verteilt kleine, schmale Ansammlungen. Die zweite Subpopulation setzte sich aus unregelmäßig geformten, polygonalen Zellen zusammen. Sie waren mit ca. $5,5 \times 14,75 \mu\text{m}$ von mittlerer Größe und hatten einen mit einer Kern-Plasma-Relation von ca. 1,3:1 bis 1,5:1 relativ großen Kern. Ihr Zytoplasma schien keine Granula zu enthalten, bildete aber konische Ausläufer (**Abb. 5-36**). Zum Teil wurden auch etwas kleinere, oft dreieckige Zellen detektiert, die umgekehrt zwar keine Fortsätze, aber feingranuläres Zytoplasma aufwiesen (**Abb. 5-38**). Sie entsprachen morphologisch am ehesten den klassischen Gewebemakrophagen. Eine mäßige Affinität zum perivaskulären Bindegewebe war bei allen Zellpopulationen in ähnlicher Weise vorhanden.

Ein entsprechendes Bild bot sich auch in den von den Kehllappen stammenden Hautproben dar, lediglich die Zahl der subepidermalen Zellen war hier eventuell etwas geringer. Anzahl und zum Teil auch Verteilung der CVI-ChNL-74.2⁺ Zellen in der dorsalen Schuppenhaut des Mittelfußes wichen jedoch erheblich von den soeben beschriebenen Verhältnissen ab. Es reagierten hier insgesamt wesentlich mehr Zellen positiv als in den anderen beiden anatomischen Regionen. Ähnlich wie dort waren die positiven Zellen zwar gleichmäßig über das gesamte Korium verteilt, es befanden sich jedoch erheblich mehr Zellen in direktem Kontakt zur Basalmembran des Stratum basale (**Abb. 5-35**). Die Präferenz für das die Blutgefäße umgebende Bindegewebe war in allen drei Lokalisationen im Vergleich zu den meisten anderen Antikörpern eher gering ausgeprägt (**Abb. 5-34**), epidermale

CVI-ChNL-74.2⁺ Zellen wurden weder in der befiederten noch in der unbefiederten Haut gesehen.

5.2.7 Färbung mit dem mAk CVI-ChNL-74.3

Dieser mAk reagiert mit einem Antigen follikulärer DCs. Auch in diesem Fall liegen keine durchflusszytometrischen Daten vor, so dass es keine Hinweise auf die Lokalisation des korrespondierenden Antigens gibt.

In den untersuchten Hautproben konnte bei Verwendung des mAk CVI-ChNL-74.3 keine spezifische Anfärbung von Zellen beobachtet werden.

5.2.8 Färbung mit den mAks anti-TCR-1 und anti-TCR-2

Bei diesen Antikörpern handelt es sich zwar nicht um myeloide Marker, sondern um solche für γ/δ - bzw. $\alpha/\nu\beta 1$ -T-Zellen. Da zumindest Erstere jedoch in der Haut von Mäusen nachgewiesen werden konnten und hier eine nicht unerhebliche Funktion in der Abwehr kutaner Antigene zu spielen scheinen, wurden sie der Vollständigkeit halber mitgetestet, jedoch mit negativem Ergebnis.

5.2.9 Negativkontrollen

Bei allen untersuchten Proben waren die Kontrollen stets vollständig negativ.

5.2.10 Zusammenfassung

Die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen der befiederten und der unbefiederten Haut wurden in den folgenden Tabellen zusammengefasst.

| | 16-6 | KUL01 | 2G11 | 3-6 |
|-------------------------------|----------|------------|-----------------|------------|
| Epidermis | | | | |
| Befiederte Haut | - (?) | + | - | - |
| Dorsale Schuppenhaut | + | - | + | + |
| Kehllappen | - | - | + | - |
| Subepidermaler Bereich | | | | |
| Befiederte Haut | + bis ++ | + | ++ | ++ |
| Dorsale Schuppenhaut | ++ | ++ | +++ | ++ |
| Kehllappen | + bis ++ | + | +++ | - |
| Dermis | | | | |
| Befiederte Haut | +++ | ++ bis +++ | +++ | + bis ++ |
| Dorsale Schuppenhaut | +++ | ++ bis +++ | +++ | + bis ++ |
| Kehllappen | +++ | ++ bis +++ | +++ (bis +++++) | + bis ++ |
| Perivaskulärer Bereich | | | | |
| Befiederte Haut | +++ | +/- | ++ bis +++ | ++ bis +++ |
| Dorsale Schuppenhaut | +++ | +/- | ++ bis +++ | ++ bis +++ |
| Kehllappen | +++ | +/- | ++ bis +++ | + |

Tabelle 5-2 a: Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung der Haut.

| | CVI-ChNL- 68.1 | CVI-ChNL- 74.2 | CVI-ChNL- 74.3 | Anti TCR-1, Anti-TCR-2 |
|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| Epidermis | | | | |
| Befiederte Haut | - | - | - | - |
| Dorsale Schuppenhaut | + | - | - | - |
| Kehllappen | - | - | - | - |
| Subepidermaler Bereich | | | | |
| Befiederte Haut | + | + | - | - |
| Dorsale Schuppenhaut | ++ | ++ | - | - |
| Kehllappen | + | +/- bis + | - | - |
| Dermis | | | | |
| Befiederte Haut | ++ | ++ | - | - |
| Dorsale Schuppenhaut | +++ | ++ bis +++ | - | - |
| Kehllappen | ++ | ++ | - | - |
| Perivaskulärer Bereich | | | | |
| Befiederte Haut | ++ bis +++ | ++ bis +++ | - | - |
| Dorsale Schuppenhaut | ++ bis +++ | ++ bis +++ | - | - |
| Kehllappen | ++ bis +++ | ++ bis +++ | - | - |

Tabelle 5-2 b: Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung der Haut.

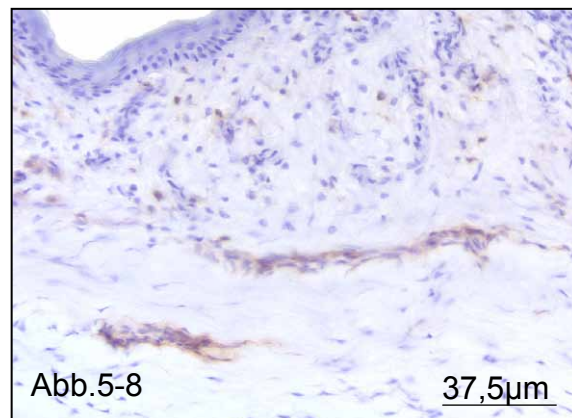
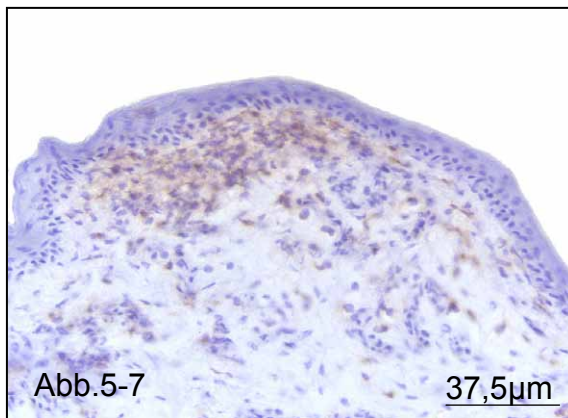
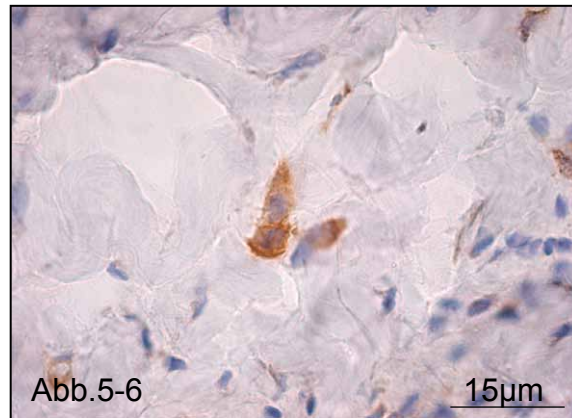
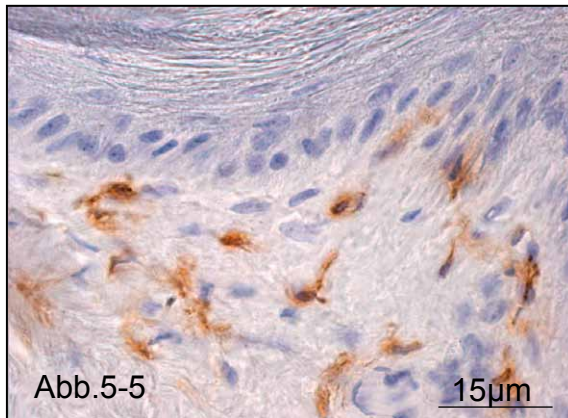
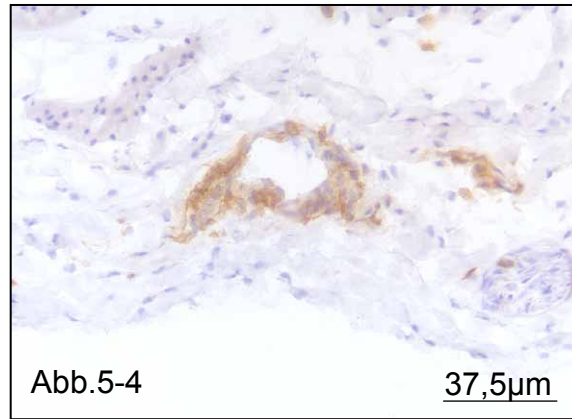
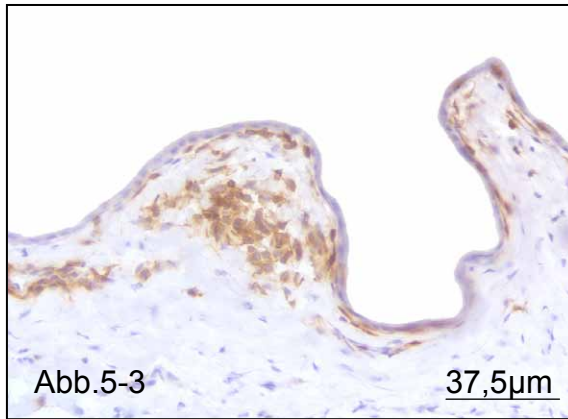


Abb. 5-3 und 5-4: Flügelhaut: Die mit dem anti-CD45 Antikörper reagierenden Zellen hatten die Tendenz Aggregate zu bilden (**Abb. 5-3**) und das perivaskuläre Bindegewebe zu besiedeln (**Abb. 5-4**).

Abb. 5-5 und 5-6: Schuppenhaut: Besonders viele CD45⁺ Zellen waren prox. im Str. superficiale lokalisiert (**Abb. 5-5**), aber auch die tieferen Schichten der Dermis enthielten regelmäßig positive Zellen (**Abb. 5-6**).

Abb. 5-7 und 5-8: Im subepidermalen Bereich der Kehllappenhaut formierten sich teils zwar größere Aggregate CD45⁺ Zellen, in der Epidermis konnten sie jedoch nicht festgestellt werden (**Abb. 5-7**). Im Allgemeinen verteilten sich die positiven Zellen in der Kehllappenhaut gleichmäßig über alle dermalen Schichten (**Abb. 5-8**).

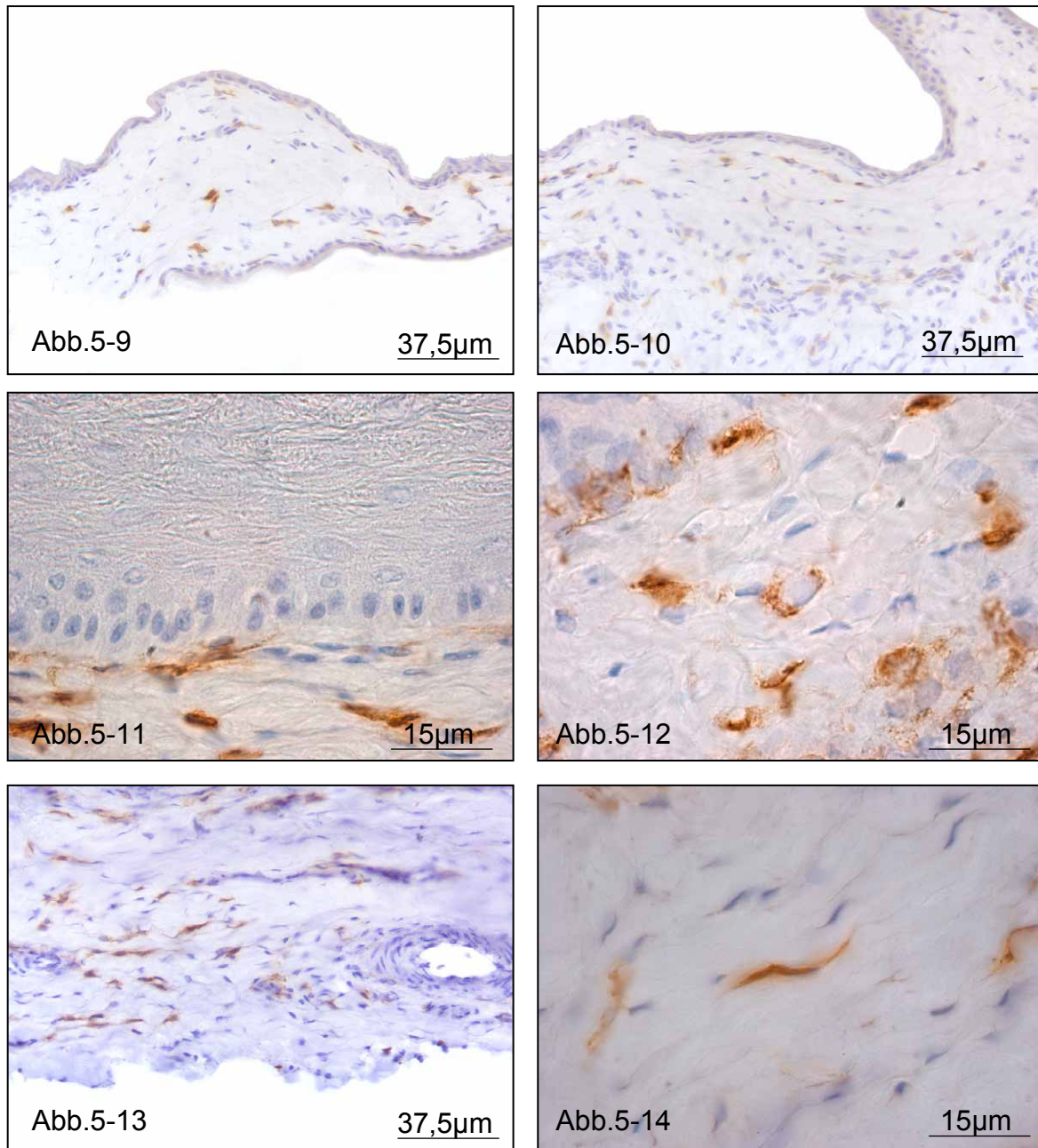


Abb. 5-9 und 5-10: In der Flügelhaut verteilen sich die KUL01⁺ Zellen gleichmäßig über das Str. superficiale und das Str. profundum.

Abb. 5-11 und 5-12: Schuppenhaut: Hier fanden sich besonders viele KUL01⁺ Zellen im prox. Bereich des Str. superficiale. Gut erkennbar ist die gestreckte Form der subepidermalen Zellen (**Abb. 5-11**), während viele der weiter distal lokalisierten Zellen eine rundlich-ovale Form aufwiesen (**Abb. 5-12**).

Abb. 5-13 und 5-14: In der Kehllappenhaut waren viele Zellen relativ weit distal lokalisiert (**Abb. 5-13**). Neben den rundlichen Zellen existierte auch hier eine zweite Subpopulation aus langen, dünnen Zellen (**Abb. 5-14**).

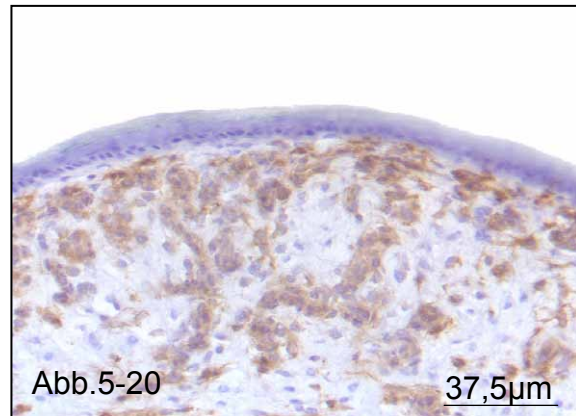
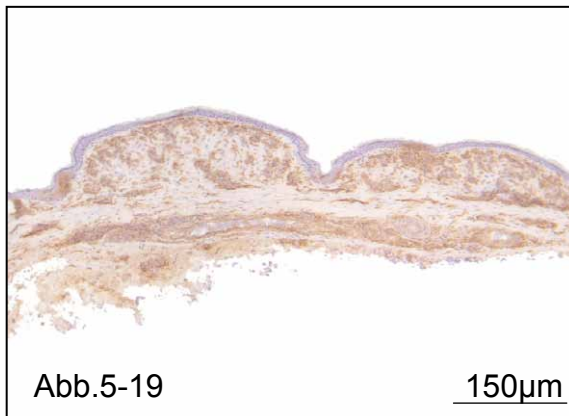
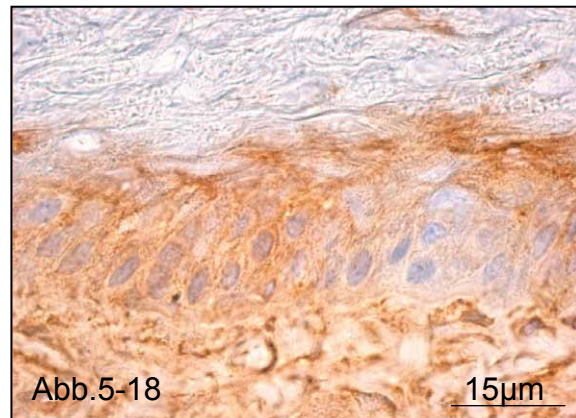
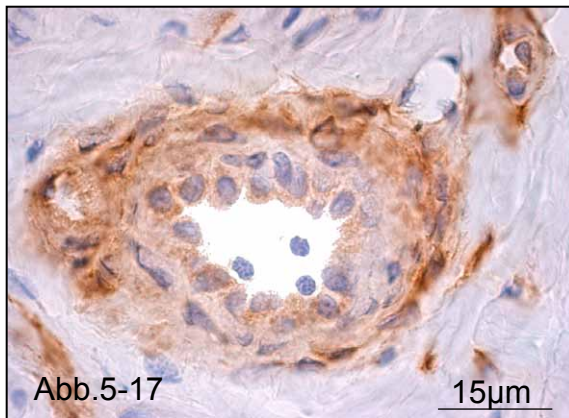
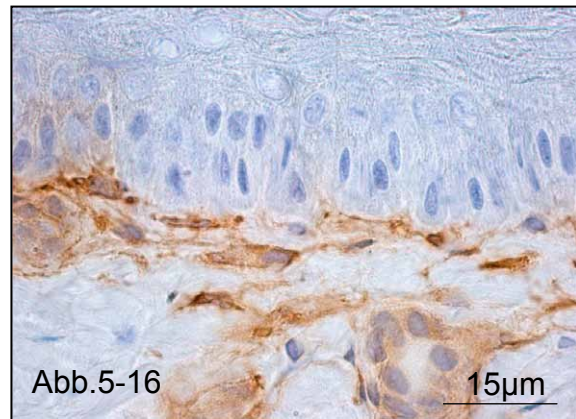
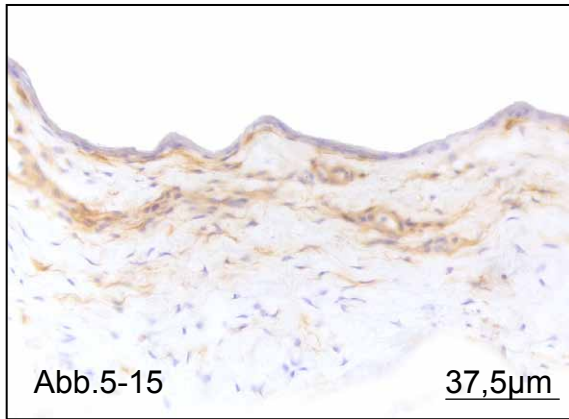


Abb. 5-15 und 5-16: Besonders viele MHC II⁺ Zellen fanden sich in den prox. Bereichen der Flügelhaut (**Abb. 5-15**). Die Zellen mit direktem Kontakt zum Str. basale waren meist sehr schmal (**Abb. 5-16**).

Abb. 5-17 und 5-18: Schuppenhaut: Perivaskuläre Ansammlungen MHC II⁺ Zellen kamen sehr häufig vor, auch die Endothelzellen reagierten spezifisch (**Abb. 5-17**). Auffallend waren insbesondere die subepidermalen Aggregate und das Vorhandensein positiver Zellen in der Epidermis (**Abb. 5-18**).

Abb. 5-19 und 5-20: Die Anzahl der MHC II⁺ Zellen war in der Kehllappenhaut besonders hoch (**Abb. 5-19**), wobei sie sich über alle Schichten verteilten. Die länglichen Zellen befanden sich dabei meist distal, die rundlichen Zellen im prox. Bereich (**Abb. 5-20**).

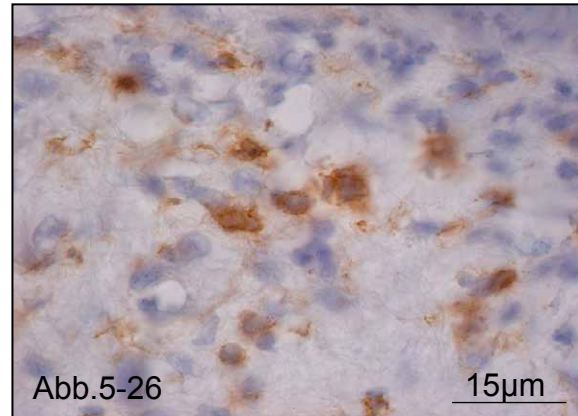
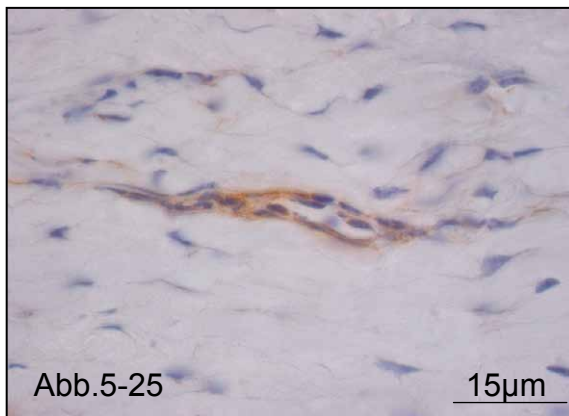
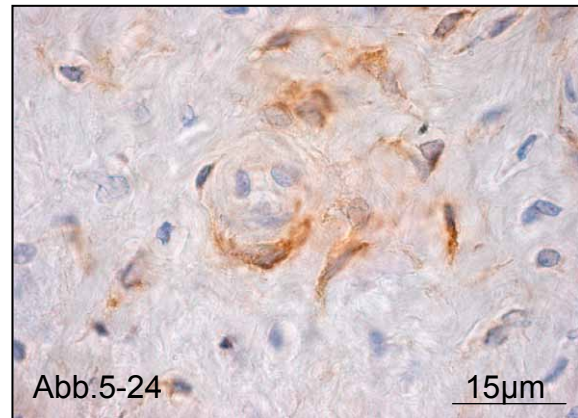
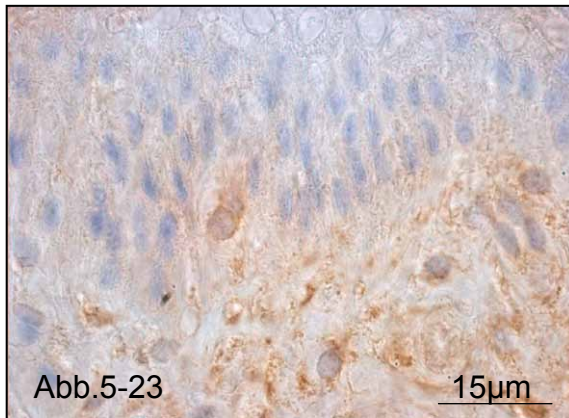
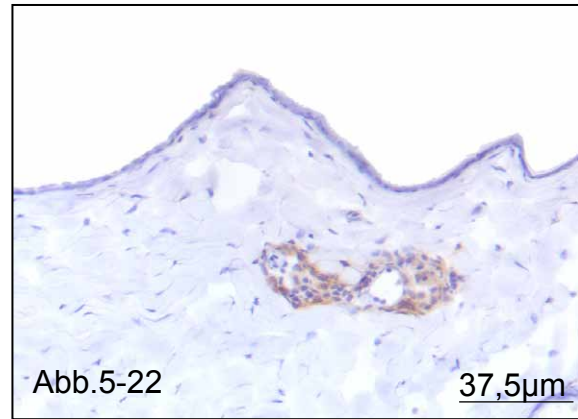
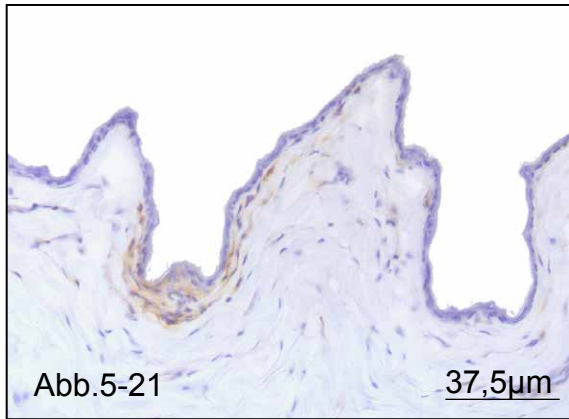


Abb. 5-21 und 5-22: Flügelhaut: Bei Färbung mit dem mAk 3-6 reagierten deutlich weniger Zellen positiv als mit den meisten anderen AK. Die Zellen wurden u.a. regelmäßig im subepidermalen (**Abb. 5-21**) und im perivaskulären Bereich (**Abb. 5-22**) angetroffen.

Abb. 5-23 und 5-24: Die subepidermalen 3-6⁺ Zellen der Schuppenhaut waren interessanterweise von meist runder Form (**Abb. 5-23**). In den tieferen Bereichen der Dermis waren jedoch beide Subpopulationen etwa gleich stark vertreten (**Abb. 5-24**).

Abb. 5-25 und 5-26: Im Str. compactum der Kehllappenhaut bildeten längliche 3-6⁺ Zellen oft kleinere, strichförmige Aggregate (**Abb. 5-25**). Daneben traten in der Dermis auch rundliche Zellen auf, die aber eher im Str. superficiale lokalisiert waren (**Abb. 5-26**).

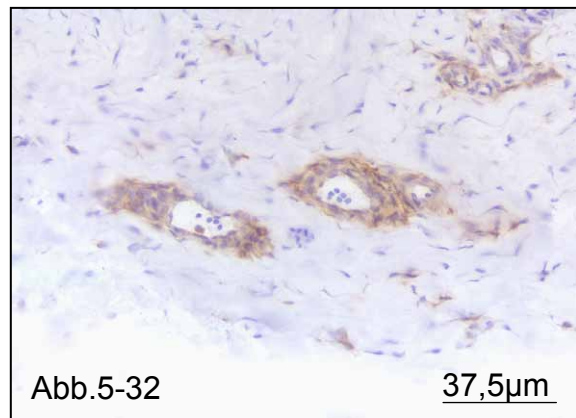
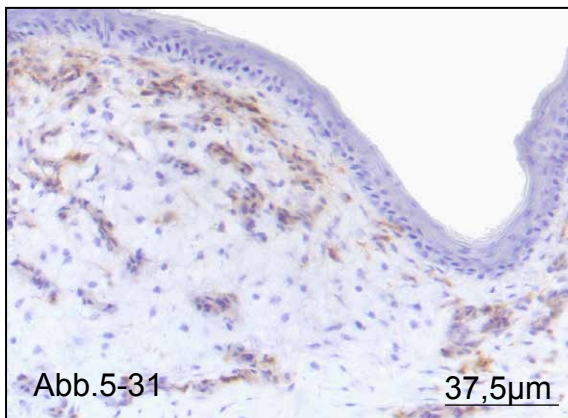
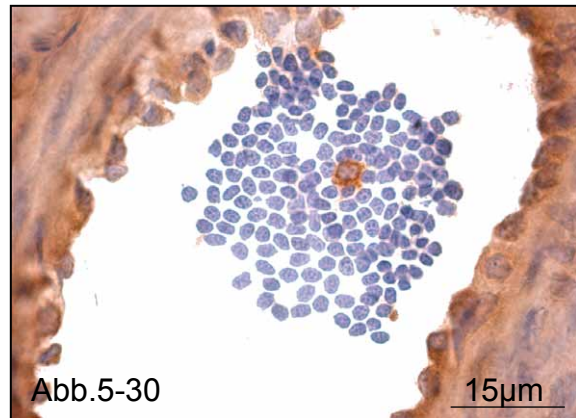
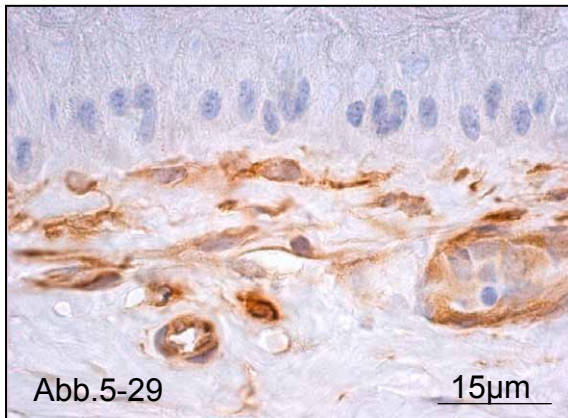
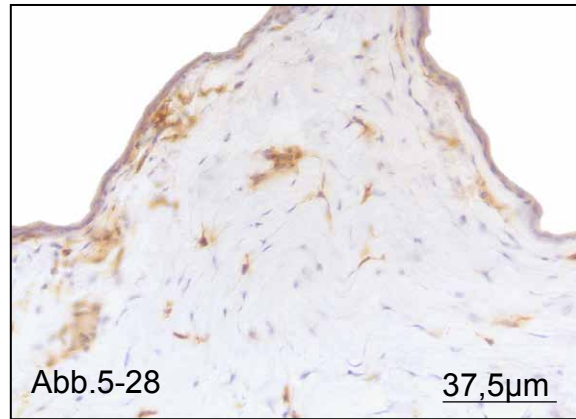
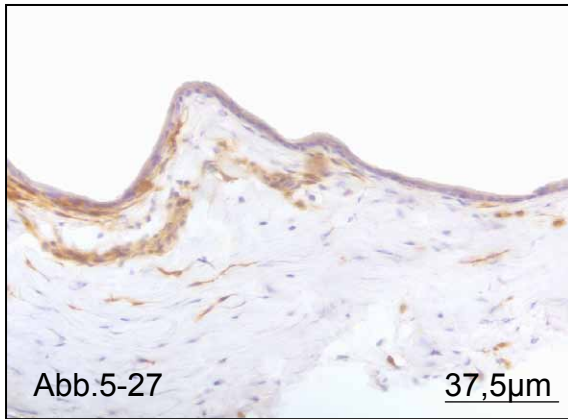


Abb. 5-27 und 5-28: Die wenigen subepidermalen CVI-ChNL-68.1⁺ Zellen in der Flügelhaut waren oft lokal konzentriert (**Abb. 5-27**). Kleinere Aggregate traten auch in den tieferen Dermissschichten auf (**Abb. 5-28**).

Abb. 5-29 und 5-30: In der Schuppenhaut wurden CVI-ChNL-68.1⁺ Zellen im subepidermalen Bereich etwas häufiger angetroffen (**Abb. 5-29**). Ähnlich wie bei Färbung mit dem mAk 2G11 reagierten neben den perivaskulären Zellen auch die Endothelzellen sehr spezifisch (**Abb. 5-30**).

Abb. 5-31 und 5-32: Die Endothelzellen der Gefäße der Kehllappenhaut reagierten ebenfalls positiv (**Abb. 5-32**). Obwohl sich auch relativ viele Zellen im Str. superficiae anfärbten, war die Anzahl der positiven subepidermalen Zellen eher gering (**Abb. 5-31**).

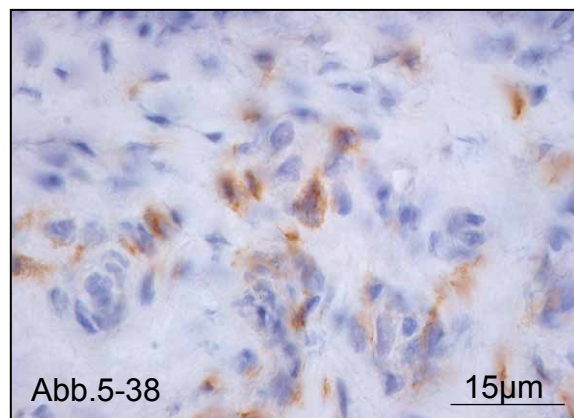
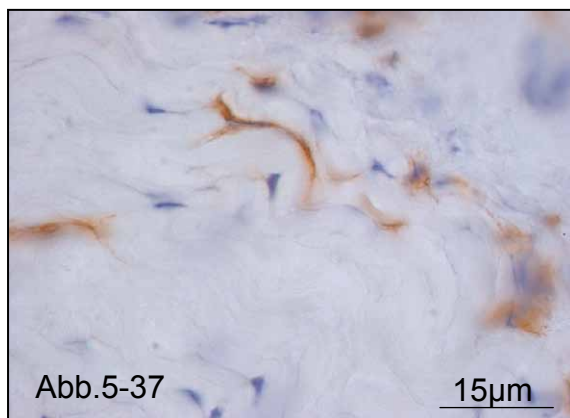
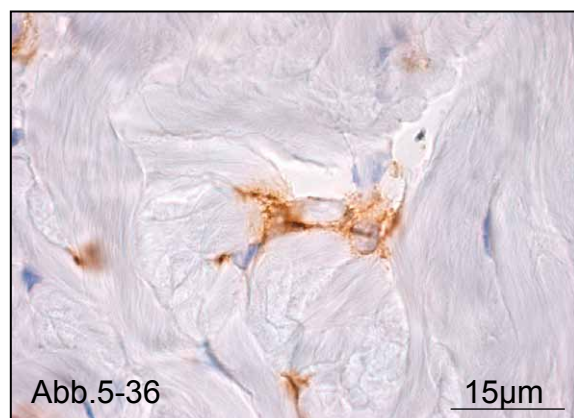
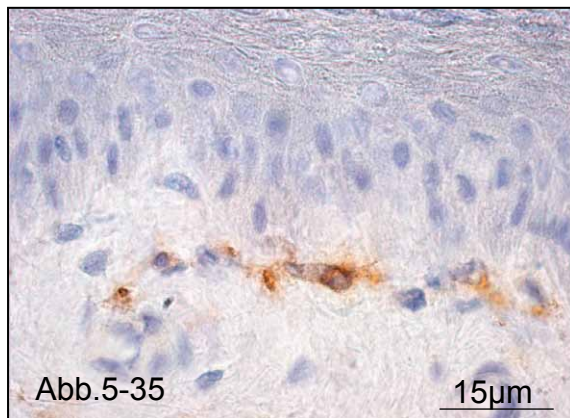
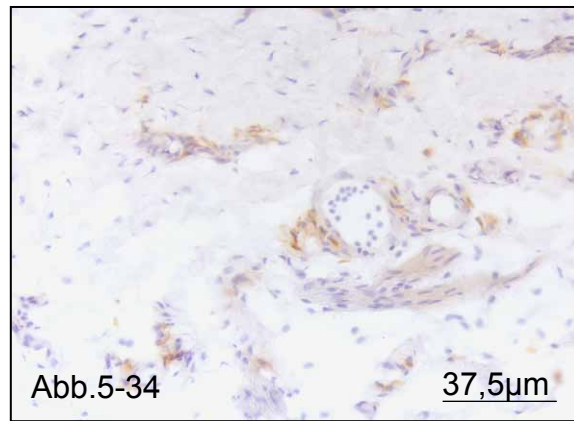
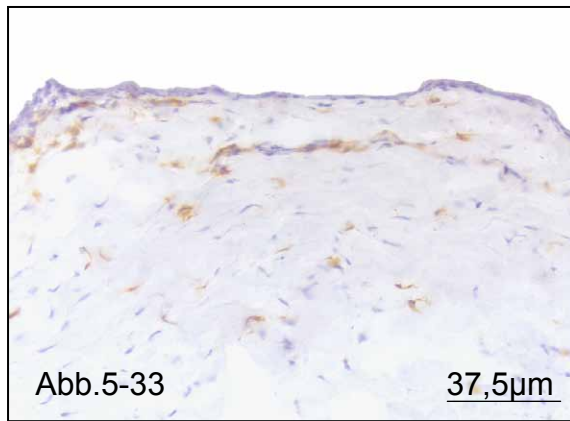


Abb. 5-33 und 5-34: Die Anzahl der CVI-ChNL-74.2⁺ Zellen in der Flügelhaut war insgesamt recht gering (**Abb. 5-33**). Auch die Affinität zum perivaskulären Bereich war nicht ganz so stark ausgeprägt wie bei den meisten anderen AK (**Abb. 5-34**).

Abb. 5-35 und 5-36: Im subepidermalen Bereich der Schuppenhaut reagierten etwas mehr Zellen positiv auf diesen AK (**Abb. 5-35**) als in der befiederten Haut. Unregelmäßig geformte, polygonale Zellen mit feinen Ausläufern (**Abb. 5-36**) waren über die gesamte Dermis verteilt.

Abb. 5-37 und 5-38: In der Kehllappenhaut konnten, analog zu den beiden anderen Regionen, zwei Subpopulationen CVI-ChNL-74.2⁺ Zellen unterschieden werden. Die eine bestand aus länglichen (**Abb. 5-37**), die andere aus polygonalen, oft dreieckigen Zellen (**Abb. 5-38**).

5.3 HE-Färbung der Bursa

Bei der Bursa fabricii/cloacalis handelt es sich um ein dorsal der Kloake gelegenes rundes oder ovales Hohlorgan, welches über einen kurzen Kanal (Bursastiel, *Collum bursae cloacalis*) in direkter Verbindung mit dem Proktodaeum steht.

Insgesamt wurden fünf Bursen von jeweils ca. neun Wochen alten männlichen und weiblichen M11-Hühnern untersucht. Diese Altersstufe war in Vorversuchen ermittelt worden und erwies sich deshalb als optimal, da bei diesen jung-adulten Tieren die Bursen zwar schon voll entwickelt, aber noch keinerlei Anzeichen der mit der Geschlechtsreife einsetzenden Involution erkennbar waren. Durch die HE-Färbung des Organs sollte eine Übersicht über den Aufbau und die Struktur der Bursa gewonnen werden, um die anschließenden immunhistologischen Untersuchungen besser beurteilen und auswerten zu können.

5.3.1 Allgemeine lichtmikroskopische Befunde der Bursa

Bei allen untersuchten Bursen war die aus Bindegewebe bestehende Organwand relativ dick. Ihr Durchmesser variierte innerhalb der einzelnen Organe zwischen 200 und 450 μm , der Durchschnitt lag bei ca. 300 μm . Vereinzelt konnten innerhalb der Bursawand größere Blutgefäße ausgemacht werden.

Die Unterteilung des Organs erfolgte durch primäre, mit kubischem Epithel bedeckte Längsfalten (*Plicae bursales*) sowie von diesen abgehende Sekundär- und Tertiärfalten. Innerhalb dieser Falten befanden sich eine große Anzahl von Lymphknötchen (*Folliculi lymphatici*), welche wiederum durch 10-13 μm breite Bindegewebssepten (*Septa interfollicularia*) voneinander getrennt waren. Die Follikel wiesen eine deutliche Zweiteilung in eine äußere Rindenzone (Kortex) und einen inneren Markbereich (Medulla) auf (**Abb. 5-39**). Ihre Größe war, bedingt durch die unterschiedlichen Anschnittebenen, äußerst heterogen, lag im Durchschnitt jedoch bei 450 x 650 μm . Dabei bildete der Kortex einen ca. 75 μm dicken Ring rund um die Medulla. Die Trennung beider Bereiche erfolgte durch eine Basalmembran. In der HE-Färbung war erkennbar, dass es sich bei den Rinde und Mark bildenden Zellen offensichtlich um Lymphozyten handelt, wobei die Rindenzone eher dicht gepackte kleinere Zellen (rund, etwa 5,0 x 5,5 μm , sehr großer, zentraler Zellkern) enthielt, während die Zellen im Markbereich meist etwas größer (6,5 x 7,5 μm) und dabei lockerer angeordnet waren. Ein weiterer Unterschied lag darin, dass im Bereich der Rinde sehr viele Kapillaren erkennbar waren, das Mark jedoch keine Blutgefäße aufwies. Die Verteilung der kortikalen Blutgefäße war dabei zu Gunsten der in der Nähe der Basalmembran liegenden

Kapillaren verschoben. Auch in der interfollikulären *Lamina propria* wurden regelmäßig größere Blutgefäße nachgewiesen. Eine eindeutige Identifikation von Lymphgefäßen war auf lichtmikroskopischem Niveau jedoch weder im Mark noch in der Rinde der Follikel möglich.

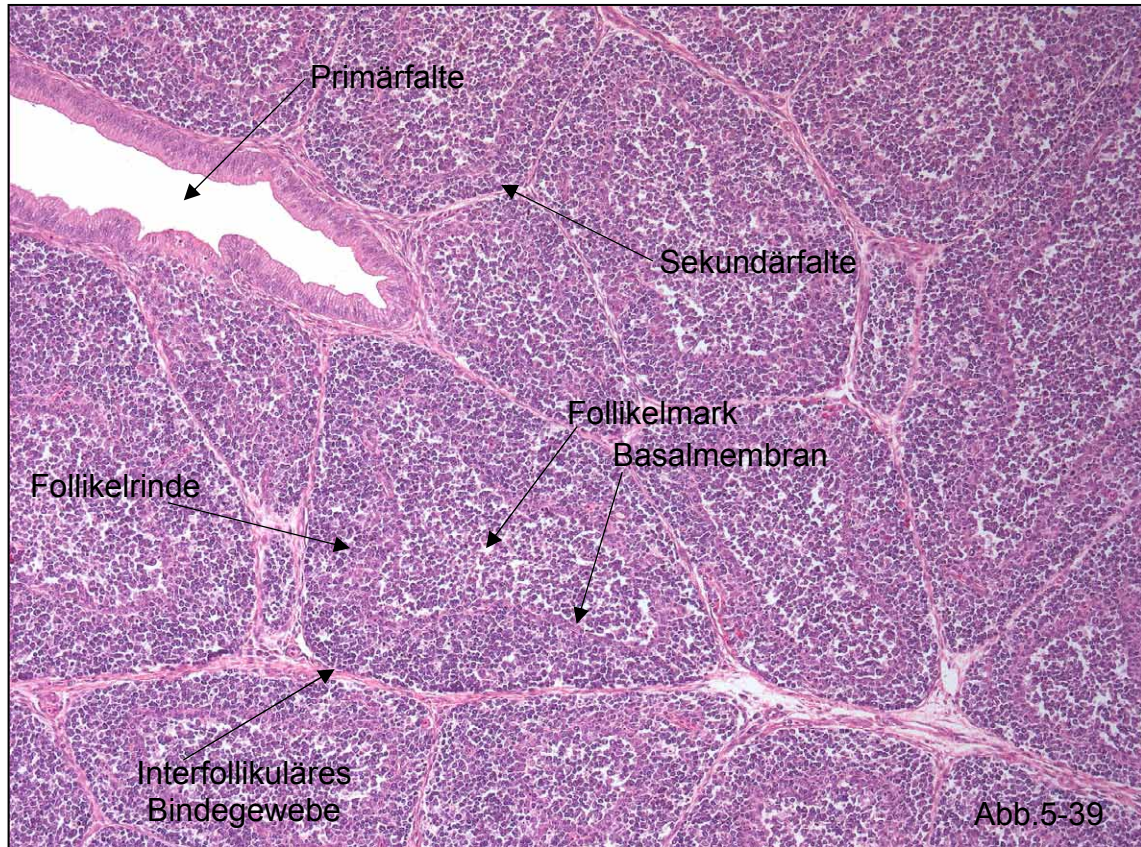


Abb.5-39: Übersichtsaufnahme der Bursa, HE, 40-fach.

5.3.2 Zusammenfassung

In der folgenden Tabelle wurden die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen der Bursen zusammengefasst.

| | |
|----------------------------------|---|
| Bursawand | Bindegewebige Kapsel, Dicke \varnothing 300 μm , enthält vereinzelt größere Blutgefäße |
| Längsfalten | Mit kubischem Epithel bedeckt |
| Interfollikulärer Bereich | Bindegewebe, Breite 10-13 μm |
| Follikelrinde | Ca. 75 μm breiter Ring rund um die Medulla, bestehend aus dicht angeordneten kleinen Zellen (5,0 x 5,5 μm , rundlich, Kern sehr groß, zentral), Kapillaren v.a. im Bereich der Basalmembran |
| Follikelmark | Größe ca. 375 x 575 μm , besteht aus locker angeordneten Zellen (6,5 x 7,5 μm , rundlich, Kern sehr groß, zentral), keine Blutgefäße |

Tabelle 5-3: Ergebnisse der histologischen Untersuchung der Bursa fabricii.

5.4 Immunhistologische Untersuchung der Bursa

Die für die HE-Färbung verwendeten Bursen sind vor der Fixierung halbiert worden, so dass jeweils eine Hälfte auch für die immunhistologischen Untersuchungen verwendet werden konnte.

5.4.1 Färbung mit dem mAk 16-6

Die Färbung mit dem Panleukozytenmarker 16-6 diente in erster Linie als Positivkontrolle. Sie führte stets zu einer homogenen Anfärbung aller Bursastrukturen mit Ausnahme des Epithels der Plicae bursales, in dem es nur zu vereinzelt positiven Reaktionen kam (**Abb. 5-40**). Die betroffenen Zellen waren im Durchschnitt ca. $6,5 \times 7,0 \mu\text{m}$ groß und rundlich geformt. Sie wiesen ovale Kerne mittlerer Größe auf, die meist exzentrisch im homogenen Zytoplasma ausgerichtet waren. Morphologisch identische Zellen in der gleichen Lokalisation konnten im Übrigen auch durch Färbung der Proben mit den mAk 2G11 und 3-6 identifiziert werden. In den späteren Kapiteln wird darauf jedoch noch genauer eingegangen.

Die meisten der zahlreichen CD45^+ Zellen im Bereich des Follikelmarks lagen mit einem Durchmesser von durchschnittlich $6,5 \times 7,5 \mu\text{m}$ in der gleichen Größenordnung wie diejenigen in den Plicae bursales. Sie waren gleichmäßig, annähernd rund geformt und hatten einen großen, zentral gelegenen Kern. Die Kern-Plasma-Relation betrug etwa 2:1, das ringförmig um den Kern gedrängte Zytoplasma war weder durch eine granuläre noch durch eine ausgesprochen hyaline Struktur gekennzeichnet.

Auch im Follikelkortex waren massenhaft CD45^+ Zellen anzutreffen. Sie waren mit ca. $5,0 \times 5,5 \mu\text{m}$ etwas kleiner als diejenigen im Mark, wiesen aber ansonsten die gleiche Morphologie auf.

Die Zellen im subepithelialen Bereich waren ebenfalls sämtlich CD45^+ . Die Dichte der Zellen war hier noch etwas höher als im Follikelkortex oder der Medulla, so dass aufgrund der zahlreichen Überlagerungen die Morphologie der Einzelzelle sehr schwierig zu beurteilen war. Die Mehrzahl der Zellen schien jedoch mit einem Durchmesser zwischen $9,0$ und $11,0 \mu\text{m}$ etwas größer zu sein als diejenigen in den zuvor erwähnten Lokalisationen. Ihre Form war ebenfalls rundlich, zum Teil auch oval, die Kerne waren entweder sehr groß (Kern-Plasma-Relation ca. 2:1) und lagen im Zentrum oder sie waren etwas kleiner (Kern-Plasma-Relation zwischen 1:1,5 und 1:1) und peripher lokalisiert.

Ähnlich große und geformte CD45^+ Zellen mit mittelgroßem, meist exzentrischem Kern fanden sich auch im interfollikulären Bindegewebe. Daneben traten hier auch einige wenige

wesentlich schmalere Zellen mit einer Länge von bis zu 16 µm auf. Regelmäßig konnten an den „Enden“ dieser Zellen auch fragile Zytoplasmaausläufer beobachtet werden. Der Kern war der Zellform angepasst, länglich-oval. Ein ähnliches Bild konnte im interfollikulären Bindegewebe auch durch die Anfärbung mit den mAk KUL01 (**Abb. 5-41**) und CVI-ChNL-68.1 erreicht werden, worauf in den nächsten Kapiteln noch genauer eingegangen werden soll.

Die Bursawand enthielt ebenfalls zahlreiche CD45⁺ Zellen. Diese waren größtenteils gleichmäßig verteilt, im Bereich der Blutgefäße kam es jedoch regelmäßig zur Akkumulation von Zellen. Die meisten dieser perivaskulären Zellen wiesen alle morphologischen Kriterien von Monozyten/Makrophagen auf. So hatten sie eine annähernd runde Zellform mit einem Durchmesser von durchschnittlich 11,5 µm, einen relativ großen, exzentrisch liegenden Kern sowie ein mehr oder weniger stark granulär strukturiertes Zytoplasma. Auch in den anderen Bereichen der Bursawand konnten ähnlich geformte Zellen ausgemacht werden. Das Gros wies jedoch eine völlig andere Morphologie auf. Es handelte sich um polymorphe, meist jedoch längliche Zellen mit feinen Zytoplasmafortsätzen. Ihre Größe belief sich im Durchschnitt auf ca 5,0 x 14,0 µm, variierte insgesamt jedoch sehr stark. Der Zellkern befand sich meist peripher und war von länglich-ovaler Gestalt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ergebnisse der Färbung mit dem mAk 16-6 sehr gut mit denjenigen der HE-Färbung korrelieren. Bereits hier war deutlich zu erkennen gewesen, dass die Bursa, und hierbei insbesondere die Bursafollikel, zum Großteil aus Lymphozyten besteht, wie es auch in der Literatur seit langem bekannt ist (306).

5.4.2 Färbung mit dem mAk KUL01

Der mAk KUL01, der im Vergleich zum anti-CD45 Antikörper nur Zellen des mononukleären Phagozytosesystems des Huhns erkennt, färbte erwartungsgemäß wesentlich weniger Zellen an.

Die hochspezifische Färbung betraf dabei lediglich eine kleinere Anzahl von in den interfollikulären Bindegewebssepten (**Abb. 5-41**) sowie von subepithelial lokalisierten Zellen. Die betroffenen Zellen waren mit durchschnittlich 11,0 x 12,0 µm etwas größer als die meisten der CD45⁺ Zellen, ihre Form ebenfalls rund, während der Kern oft exzentrisch lag und mit einer Kern-Plasma-Relation von 1:1,5 bis 1:1 relativ gesehen kleiner war als die Kerne des Großteils der mit mAk 16-6 reagierenden Zellen. Das Zytoplasma dieser Zellen wies meist eine sehr starke Granularität auf. Daneben war, zumindest im Interfollikularraum, auch eine etwas kleinere Population langer, schmaler Zellen zu erkennen. Deren Zellkörper

waren ca. 4,5 x 14,5 µm groß und enthielten mittelgroße, oval geformte Kerne. Außerdem hoben sie sich von der ersteren Zellpopulation durch die Ausbildung feiner Zytoplasmaausläufer an den Zellenden ab. Deren Länge konnte zwar anschnittbedingt nicht exakt bestimmt werden, schien aber teilweise sogar diejenige des Somas zu erreichen.

Zusätzlich zu den beiden Subpopulationen KUL01⁺ Zellen im Interfollikularraum konnten wir einige wenige, morphologisch ähnliche Zellen auch in der Bursawand detektieren (**Abb. 5-42**). Lediglich die Relation beider Populationen zueinander war hier anders, da im Gegensatz zu den interfollikulären Bereichen die schmalen, „dendritisch“ geformten Zellen überwogen. Das Epithel der Primärfalten, Follikelrinde sowie –medulla enthielten keine KUL01⁺ Zellen.

5.4.3 Färbung mit dem mAk 2G11

Bei den gegen MHC II-Moleküle gerichteten Antikörpern gelang bei der Bursa mit dem mAk 2G11 eine spezifischere Färbung als mit dem mAk LD42, weswegen bei der Auswertung der Schnitte nur der erste Antikörper berücksichtigt wurde.

Er führte, ähnlich wie der mAk KUL01, zu einer positiven Reaktion von im subepithelialen Bereich lokalisierten Zellen (**Abb. 5-44**). Die Anzahl der positiv reagierenden Zellen war jedoch im Vergleich zum mAk KUL01 deutlich höher. Es handelte sich um mittelgroße, rundliche, manchmal auch dreieckige Vertreter mit einem Durchmesser von bis zu 12,5 µm. Ihre mittelgroßen bis großen Kerne lagen exzentrisch und wurden von granulärem Zytoplasma umgeben. Regelmäßig konnte beobachtet werden, dass sich zwei oder drei dieser Zellen dicht aneinander lagerten. Im Gegensatz zur Färbung mit dem mAk KUL01 konnten jedoch keine positiven Zellen im interfollikulären Bindegewebe ausgemacht werden.

In der Bursawand dagegen wurden sehr spezifische Reaktionen mäßig vieler bis vieler Zellen beobachtet (**Abb. 5-43**). Die Population der wandständigen Zellen war dabei recht heterogen. Sie bestand unter anderem aus einigen wenigen rundlich-ovalen Zellen mit einer durchschnittlichen Größe von 5,0 x 7,5 µm. Ihre meist ebenfalls rundlich-ovalen Kerne waren sehr groß, so dass die Kern-Plasma-Relation ca. 2:1 betrug, während das Zytoplasma nur einen dünnen, perinukleären Ring bildete. Der weitaus größere Teil der wandständigen Zellpopulation wurde jedoch von unregelmäßig geformten, meist länglichen Zellen repräsentiert. Ihre Breite war mit 2,0 bis 4,5 µm relativ variabel, die Länge betrug im Durchschnitt ca. 13,0 µm, zuzüglich mehrerer feiner Zytoplasmaausläufer. Diese schienen an ihrem Ursprung breiter zu sein als in der Peripherie, so dass eine genaue Differenzierung zwischen Soma und Ausläufer nur bedingt möglich war. Auch die Länge der Ausziehungen

war schwierig zu beurteilen, bedingt durch die zweidimensionale Ansicht und die verschiedenen Schnittebenen. Der meist ovale Kern wurde oft in randständiger, zum Teil auch in zentraler Ausrichtung angetroffen. Sie wiesen als einzige der wandständigen Zellarten eine gewisse Affinität zu den enthaltenen Blutgefäßen auf. Selten wurden auch kleine runde Zellen von ca. 5,0 µm Durchmesser angetroffen. Diese zeichneten sich durch einen peripher gelegenen, relativ großen, runden Kern aus.

Die intraepithelialen Zellen waren nur vereinzelt MHC II⁺. In diesem Fall handelte es sich um rundlich-ovale Zellen mit einem ovalen, exzentrisch gelegenen Kern mittlerer Größe und homogenem Zytoplasma. Ihre Größe betrug bis zu 6,5 x 7,5 µm, war bei einzelnen Zellen jedoch zum Teil deutlich geringer.

Interessanterweise war das Gros der intrafollikulären Zellen und damit der Lymphozyten ebenfalls MHC II⁺. Nur eine sehr kleine Population der hier lokalisierten Zellen reagierte positiv auf Färbung mit dem mAk 2G11. Die meisten von ihnen befanden sich in der Peripherie der Rinde, oft in direktem Kontakt zum interfollikulären Bindegewebe. Extrem selten befand sich eine MHC II⁺ Zelle auch intramedullär. Es handelte sich in diesem Fall um unregelmäßig geformte, polygonale Zellen, die eine durchschnittliche Größe von 7,0 x 12,0 µm erreichten. Der große Kern lag zentral, die Kern-Plasma-Relation lag bei etwa 1,5:1 bis 2:1. Die positiven Zellen in der Rinde dagegen wiesen eine mehr ovale Form auf und waren bei gleicher Länge mit etwa 10,0 µm deutlich breiter als diejenigen im Mark. Ihr Kern hatte mit einer Kern-Plasma-Relation von ca. 2:1 eine ähnliche Größe, lag jedoch exzentrisch im granulären Zytoplasma. Manche der intrakortikalen MHC II⁺ Zellen waren rundlich, mit ca. 5,0 x 6,0 µm wesentlich kleiner und hatten einen zentral gelegenen Kern.

Was die kleinen Blutgefäße an der Grenze zwischen Medulla und Kortex betrifft, so exprimierten diese überraschenderweise große Mengen an MHC II-Molekülen.

5.4.4 Färbung mit dem mAk 3-6

Wie bereits erwähnt ist die Bindespezifität des mAk 3-6 noch nicht bekannt. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass er im weitesten Sinne mit myeloiden, eventuell sogar spezifisch mit dendritischen Zellen interagiert.

Er färbte relativ viele Zellen in den Randzonen des follikulären Kortex, im direkten Kontakt zum interfollikulären Bindegewebe an (**Abb. 5-45**). Selten handelte es sich dabei um kleine, runde Zellen von durchschnittlich 5,0 µm Durchmesser. Ihre Kerngröße lag mit einer Kern-Plasma-Relation von ca. 2:1 im oberen Bereich. Wesentlich häufiger konnten bis zu doppelt so große, unregelmäßig geformte Zellen mit mäßig großem Kern ausgemacht werden. Ihr

Zytoplasma schien mehrere schmale Ausläufer zu formen. Da diese Zellen oft gehäuft und in regelrechten Konglomeraten auftraten, war eine exakte Beschreibung ihrer Morphologie jedoch nur bedingt möglich.

Direkt im interfollikulären Bindegewebe konnten ebenfalls einige wenige 3-6⁺ Zellen ausgemacht werden. Ihre Größe lag mit etwa 8,75 x 12,5 µm im mittleren Bereich, die ebenfalls mittelgroßen Zellkerne lagen exzentrisch in den unregelmäßig geformten Zellkörpern. Auch im Bindegewebe der Bursawand waren einige wenige, zum Teil deutlich schmälere, ansonsten aber sehr ähnliche Zellen vorhanden.

Analog zur Färbung mit dem mAk CVI-ChNL-68.1 reagierten relativ viele der im subepithelialen Bereich lokalisierten Zellen ebenfalls positiv. Es handelte sich dabei um kleinere, oval geformte Zellen von ca. 5,0 x 7,5 µm, mit sehr großem, zentralem Kern. Zusätzlich traten ähnlich große Zellen auf, deren Kerne jedoch deutlich kleiner und exzentrisch gelegen waren. Da die subepithelialen Zellen jedoch eine gewisse Tendenz zur Akkumulation aufwiesen, waren auch hier eine exakte Differenzierung der einzelnen Subpopulationen und eine genaue Bestimmung ihrer Größe und Form nicht immer möglich.

Ähnlich wie der mAk 2G11 war auch der mAk 3-6 in der Lage intramedulläre Zellen spezifisch anzufärben (**Abb. 5-46**). Diese waren jedoch nur in sehr geringer Anzahl vorhanden und erreichten Größen von bis zu 10,0 x 15,0 µm. Ihre Form war unregelmäßig oder polygonal, der mittelgroße Kern lag zentral im homogenen Zytoplasma.

Ebenfalls analog zur Färbung mit dem mAk 2G11 konnten vereinzelte intraepitheliale Zellen detektiert werden. Sie waren von ovaler Form, durchschnittlich 5,0 x 7,0 µm groß und ebenfalls mit einem mittelgroßen, exzentrischen Kern und homogenem Zytoplasma ausgestattet.

5.4.5 Färbung mit mAk CVI-ChNL-68.1

Dieser Antikörper weist, wie bereits erwähnt, annähernd die gleiche Spezifität wie der mAk KUL01 auf.

Dementsprechend konnten mit dem mAk CVI-ChNL-68.1 ebenfalls Zellen im interfollikulären Bindegewebe nachgewiesen werden. Ihre Anzahl lag geringgradig unter derjenigen der interfollikulären KUL01⁺ Zellen, auf jeden Fall war sie jedoch deutlich geringer als diejenige der CVI-ChNL-74.2⁺ Zellen in diesem Bereich. Der Durchmesser der meist runden Zellen betrug im Durchschnitt etwa 12,0 µm, die Kern-Plasma-Relation lag bei ca. 1:2 bis maximal 1,5:2. Die Kerne waren dabei mehr oder weniger stark exzentrisch lokalisiert, das Zytoplasma von feingranulärer Struktur. Wesentlich seltener konnten,

ebenfalls analog zur Färbung mit dem mAk KUL01, schmale, längliche Zellen ausgemacht werden. Deren Zellkörper waren ca. $2,5 \times 16,5 \mu\text{m}$ groß und enthielten jeweils einen mittelgroßen, der Zellform angepassten Zellkern. Weiterhin hoben sie sich von der ersteren Zellpopulation durch die Ausbildung von fragilen, konischen Zytoplasmaausläufern ab. Deren Länge war jedoch aufgrund der verschiedenen Schnittebenen nur schwer bestimmbar.

Wesentlich höher war dagegen die Anzahl der positiven Zellen im subepithelialen Bindegewebe (**Abb. 5-47**). Sie neigten etwas zur Bildung von Aggregaten, was die Beurteilung ihrer Morphologie erheblich erschwerte. Zum überwiegenden Teil schien es sich jedoch um rundliche bis ovale Zellen zu handeln. Ihre Größe variierte relativ stark, so dass Durchmesser zwischen $7,5$ und $12,5 \mu\text{m}$ angetroffen werden konnten. Die exzentrisch gelegenen Zellkerne fielen ebenfalls durch ihre unterschiedlichen Größen auf. Die Varianz der Kern-Plasma-Relation lag daher zwischen 1:4 und 1:1. Das Zytoplasma war meist von granulärer Struktur, seltener homogen.

Im Epithel der Primärfalten wurden nur vereinzelte CVI-ChNL-68.1⁺ Zellen detektiert. Diese waren von unregelmäßiger, polygonaler Form, ca. $7,5 \times 12,5 \mu\text{m}$ groß und hatten einen kleinen bis mittelgroßen, rundlich-ovalen Zellkern, der exzentrisch im grobstrukturierten Zytoplasma lag.

Auch im folliculären Kortex bzw. in der Medulla waren einige wenige Zellen positiv (**Abb. 5-48**). Erstere hatten ungefähr die gleiche Größe wie die soeben erwähnten intraepithelialen Zellen, waren jedoch stets oval geformt und wiesen einen zwar ebenfalls kleinen, jedoch zentral gelegenen Zellkern und feinkörniges Zytoplasma auf. Die vereinzelt intramedullären CVI-ChNL-68.1⁺ Zellen lagen mit bis zu $7,5 \times 13,75 \mu\text{m}$ in derselben Größenordnung, ihr mittelgroßer Zellkern ebenfalls. Er lag entweder im Zentrum oder nur wenig exzentrisch im feingranulären Zytoplasma. Die Zellform war meist rundlich-oval, seltener auch polygonal und unregelmäßig.

Weiterhin gelang es, relativ viele Zellen in der Bursawand anzufärben. Hinsichtlich dieser Organstruktur konnten wieder Parallelen zum mAk KUL01 aufgezeigt werden, da auch bei Färbung der Proben mit dem mAk CVI-ChNL-68.1 zwei Subpopulationen in der Bursawand differenziert werden konnten. Die zahlenmäßig überlegene Subpopulation bestand aus schmalen, länglichen Zellen. Deren Zellkörper waren ca. $2,5 \times 16,5 \mu\text{m}$ groß und enthielten mittelgroße, oval geformte Kerne in meist exzentrischer Ausrichtung. Bei genauem Hinsehen konnte man zum Teil auch feine, konische Zytoplasmafortsätze ausmachen. Aus den bereits erwähnten Gründen war eine exakte Längenbestimmung dieser Fortsätze nicht möglich, teilweise schienen sie jedoch sogar die Länge des Zellkörpers zu erreichen. Die Zellen waren

dabei, abgesehen von einigen kleineren Ansammlungen, gleichmäßig über die gesamte Bursawand verteilt. Auch im perivaskulären Bereich fanden sich regelmäßig Zellen, deren Färbung jedoch vergleichsweise unspezifisch war. Die zweite, wesentlich kleinere Subpopulation der Bursawand bestand aus rundlichen, eventuell dreieckigen Zellen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 11,0 μm . Die Zellkerne waren mit einer Kern-Plasma-Relation von 1:1,5 bis 1:1 von mittlerer Größe und lagen exzentrisch, das Zytoplasma war regelmäßig von Granula durchsetzt.

Auch die Kapillaren am Übergang zwischen Medulla und Kortex reagierten positiv auf die Färbung mit dem mAk CVI-ChNL-68.1, analog zur Färbung mit dem mAk 2G11. Eventuell hängt die weiter oben erwähnte unspezifische Reaktion der perivaskulären Zellen in der Organwand mit dem dafür verantwortlichen Antigen zusammen.

5.4.6 Färbung mit dem mAk CVI-ChNL-74.2

CVI-ChNL-74.2⁺ Zellen wurden im interfollikulären Bindegewebe regelmäßig in recht großer Anzahl nachgewiesen (**Abb. 5-49 und 5-50**). Interessanterweise war die Zahl der positiven Zellen in der Lamina propria dieser Bindegewebssepten bei Färbung mit dem mAk CVI-ChNL-74.2 jedoch größer als bei Färbung mit dem mAk KUL01 (vgl. **Abb. 5-41**), obwohl CVI-ChNL-74.2 im Gegensatz zu KUL01 nur eine Subpopulation reifer Gewebsmakrophagen erkennen soll. Auch morphologisch entsprachen die detektierten Zellen nur teilweise klassischen Makrophagen. So waren lediglich einige wenige der CVI-ChNL-74.2⁺ Zellen bei einer Größe von ca. 10 x 12,5 μm von rund-ovaler bis dreieckiger Form und hatten einen exzentrisch im granulären Zytoplasma liegenden, mittelgroßen Zellkern. Die meisten Zellen waren jedoch sehr schmal und lang. Ihre Breite betrug selten mehr als 5,0 μm , während eine Länge von bis zu 30,0 μm keine Ausnahme darstellte. Bei genauem Hinsehen waren teilweise auch extrem feine Zytoplasmfortsätze zu erkennen. Der der Zellform angepasste Zellkern war meist in der Peripherie, seltener auch zentral lokalisiert, das Zytoplasma relativ homogen. Die Zellen zeigten sowohl eine Neigung zur Akkumulation als auch eine Affinität zu den in den interfollikulären Septen befindlichen Blutgefäßen.

Morphologisch ähnliche Zellen konnten in mäßig großer Anzahl auch in der Organwand detektiert werden. Auch hier wurde die große Mehrheit von den schmalen, länglichen Zellen repräsentiert. Sie zeigten ebenfalls eine wenn auch nur geringe Präferenz für den perivaskulären Bereich, neigten jedoch kaum zur Bildung von Konglomeraten. Morphologisch klassischen Makrophagen entsprechende Zellen konnten jedoch, ähnlich wie im interfollikulären Bindegewebe, nur in wesentlich geringerer Anzahl ausgemacht werden.

In den subepithelialen Bereichen kamen ebenfalls relativ viele 74.2⁺ Zellen vor. Die durchschnittliche Größe dieser rundlich-ovalen Zellen lag bei 11 x 12,5 µm, die mittelgroßen bis großen Kerne waren mehr oder weniger stark in der Peripherie des zum Teil granulären Zytoplasmas lokalisiert. Bei ihnen war wiederum eine leichte Tendenz zur Konglomeratbildung erkennbar.

Follikelmark und -rinde sowie das Epithel der Primärfalten enthielten keine CVI-ChNL-74.2⁺ Zellen.

5.4.7 Färbung mit dem mAk CVI-ChNL-74.3

Die Färbung der Bursaprobe mit dem für aviäre FDCs spezifischen mAk CVI-ChNL-74.3 führte regelmäßig zu einer relativ großen Anzahl positiver, gleichmäßig im Follikelmark verteilter Zellen (**Abb. 5-51**). Es handelte sich dabei stets um eine recht homogene, durch kleine runde, manchmal ovale Zellen vertretene Population. Ihr Durchmesser betrug durchschnittlich 5,0 µm, die Varianz war mit 2,5 bis 7,0 µm jedoch relativ stark ausgeprägt. Der der Zellform angepasste Kern nahm den Großteil des Zellinneren ein, das Zytoplasma war homogen und ließ keine Fortsätze erkennen.

Keine einzige der Proben enthielt positive Zellen in der Follikelrinde, im interfollikulären Bindegewebe, im subepithelialen Bereich, im Epithel der Primärfalten oder in der Organwand.

5.4.8 Negativkontrollen

Bei allen untersuchten Proben waren die Kontrollen stets vollständig negativ.

5.4.9 Zusammenfassung

In den folgenden Tabellen wurden die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen der Bursa zusammengefasst.

| | 16-6 | KUL01 | 2G11 | 3-6 |
|--------------------------------------|------------|----------|------------|------------|
| Bursawand | ++ bis +++ | + | ++ bis +++ | + |
| Längsfalten | +/- | - | +/- | +/- |
| Subepithelialer Bereich | ++++ | +/- | + bis ++ | ++ bis +++ |
| Interfollikuläres Bindegewebe | ++ | + bis ++ | - | + |
| Follikelrinde | +++ | - | +/- | ++ |
| Follikelmark | +++ | - | (+/-) | +/- |

Tabelle 5-4 a: Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung der Bursa fabricii.

| | CVI-ChNL-68.1 | CVI-ChNL-74.2 | CVI-ChNL-74.3 |
|--------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| Bursawand | ++ | ++ | - |
| Längsfalten | +/- | - | - |
| Subepithelialer Bereich | ++ bis +++ | ++ | - |
| Interfollikuläres Bindegewebe | + | +++ | - |
| Follikelrinde | + | - | - |
| Follikelmark | +/- | - | ++ |

Tabelle 5-4 b: Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung der Bursa fabricii.

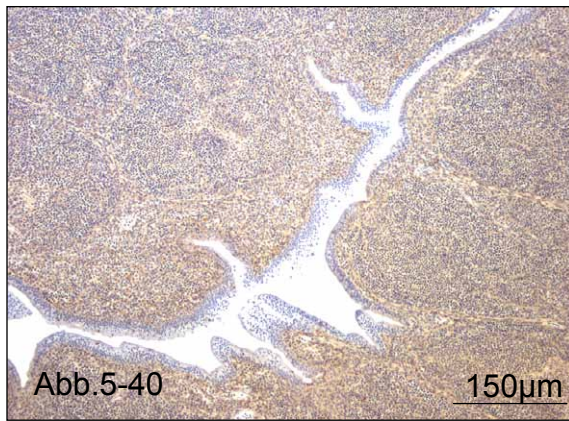


Abb. 5-40

150µm

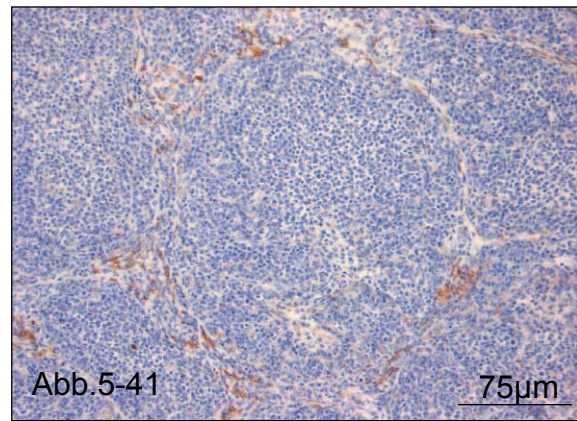


Abb. 5-41

75µm

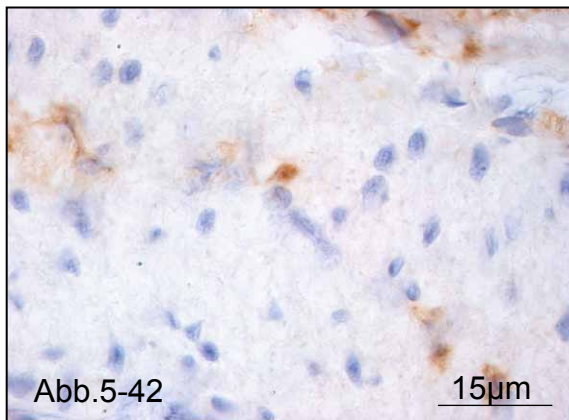


Abb. 5-42

15µm

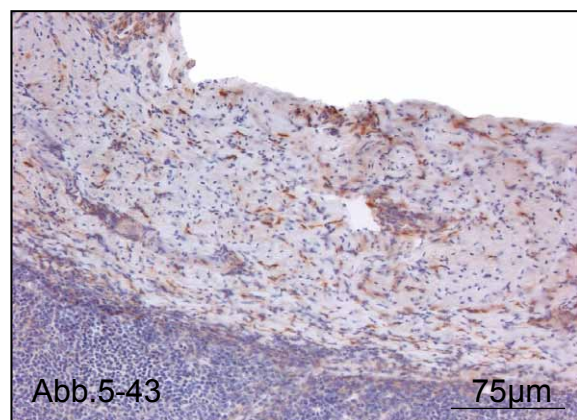


Abb. 5-43

75µm

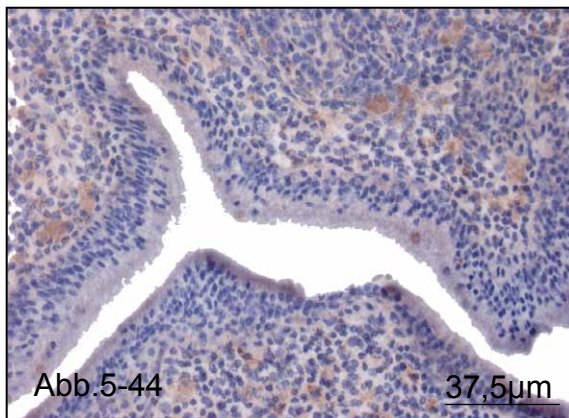


Abb. 5-44

37,5µm

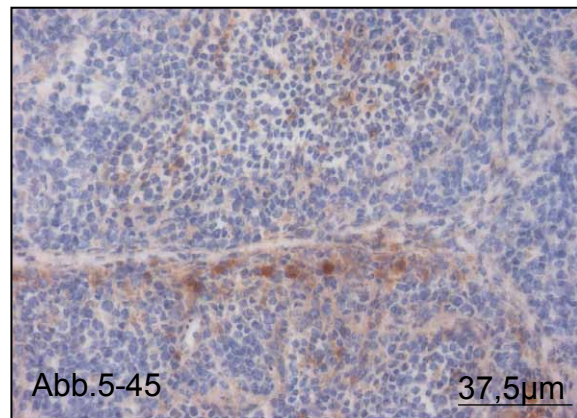


Abb. 5-45

37,5µm

Abb. 5-40: Der mAk 16-6 erkannte eine Vielzahl von Leukozyten in der Follikelrinde und im Follikelmark, während in den Epithelien der Primärfalten nur vereinzelte Zellen positiv reagierten.

Abb. 5-41 und 5-42: Mit dem mAk KUL01 interagierende Zellen wurden insbesondere im interfollikulären Bindegewebe angetroffen (**Abb. 5-41**), aber auch in der Bursawand (**Abb. 5-42**).

Abb. 5-43 und 5-44: Der mAk 2G11 färbte ebenfalls Zellen in der Bursawand an (**Abb. 5-43**), MHC II⁺ Zellen wurden aber auch in den subepithelialen Bereichen angetroffen (**Abb. 5-44**).

Abb. 5-45: Die vom mAk 3-6 erkannten Zellen waren im äußeren Rindensbereich in direkter Nachbarschaft zum interfollikulären Bindegewebe lokalisiert.

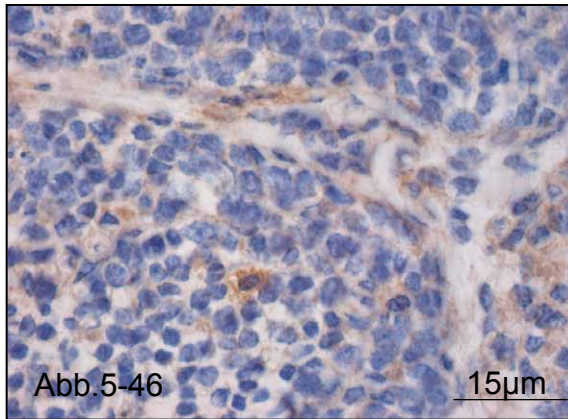


Abb. 5-46

15µm

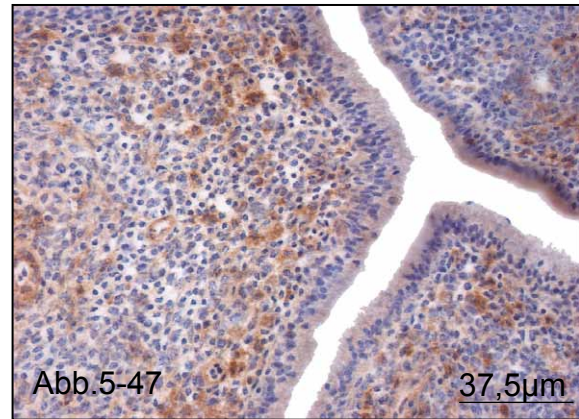


Abb. 5-47

37,5µm

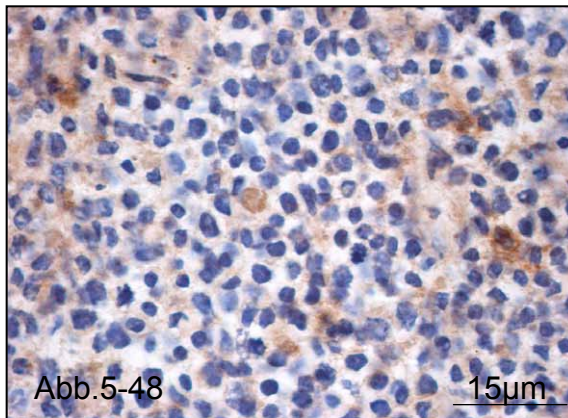


Abb. 5-48

15µm

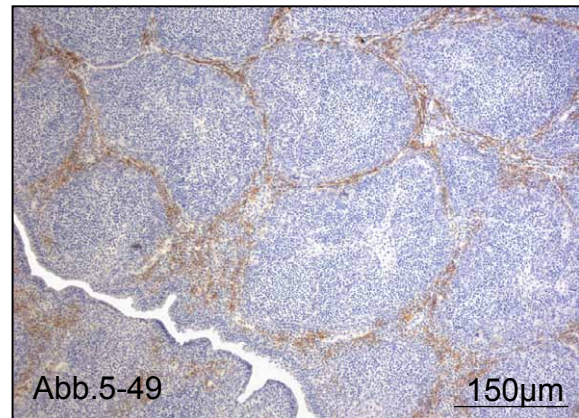


Abb. 5-49

150µm

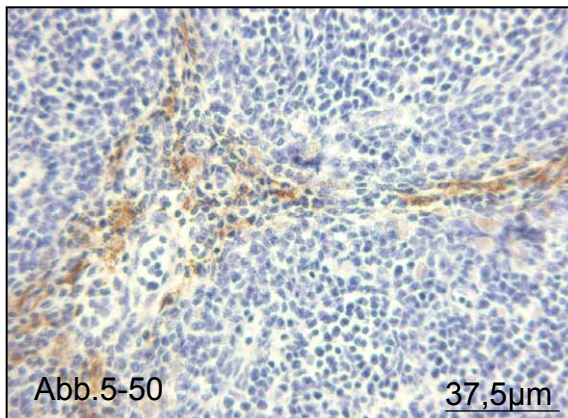


Abb. 5-50

37,5µm

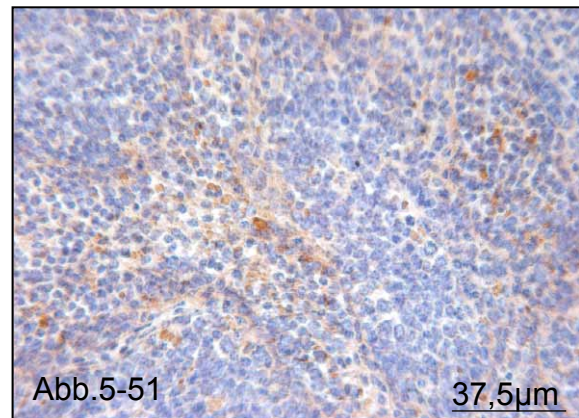


Abb. 5-51

37,5µm

Abb. 5-46: Vereinzelt konnten 3-6⁺ Zellen innerhalb der Medulla ausgemacht werden.

Abb. 5-47 und 5-48: Gut zu erkennen waren die zahlreichen subepithelialen CVI-ChNL-68.1⁺ Zellen (**Abb. 5-47**), während die Anzahl der positiven Zellen in der Medulla deutlich geringer war (**Abb. 5-48**).

Abb. 5-49 und 5-50: Der mAk CVI-ChNL-74.2 erkannte wesentlich mehr Zellen im interfollikulären Bindegewebe als der mAk KUL01 (siehe **Abb. 5-41**).

Abb. 5-51: Der für FDCs spezifische mAk CVI-ChNL-74.3 reagierte nur mit wenigen intramedullär lokalisierten Zellen.

5.5 HE-Färbung der Lunge

Analog zu den histologischen Untersuchungen von Haut und Bursa diente auch die HE-Färbung der Lunge in erster Linie dazu, einen Überblick über den Aufbau und die Struktur dieses Organs zu gewinnen (Abb. 5-52). Auf diese Weise konnten die anschließenden immunhistologischen Färbungen objektiver beurteilt und ausgewertet werden. Insgesamt wurden fünf Lungenflügel von unterschiedlichen, jeweils ca. zwölf Wochen alten männlichen und weiblichen LSL-Hühnern untersucht. Diese Altersstufe war in Vorversuchen ermittelt worden und erwies sich als gut geeignet, da das BALT zu diesem Zeitpunkt bereits voll entwickelt war und deutlich abgegrenzte Follikel enthielt.

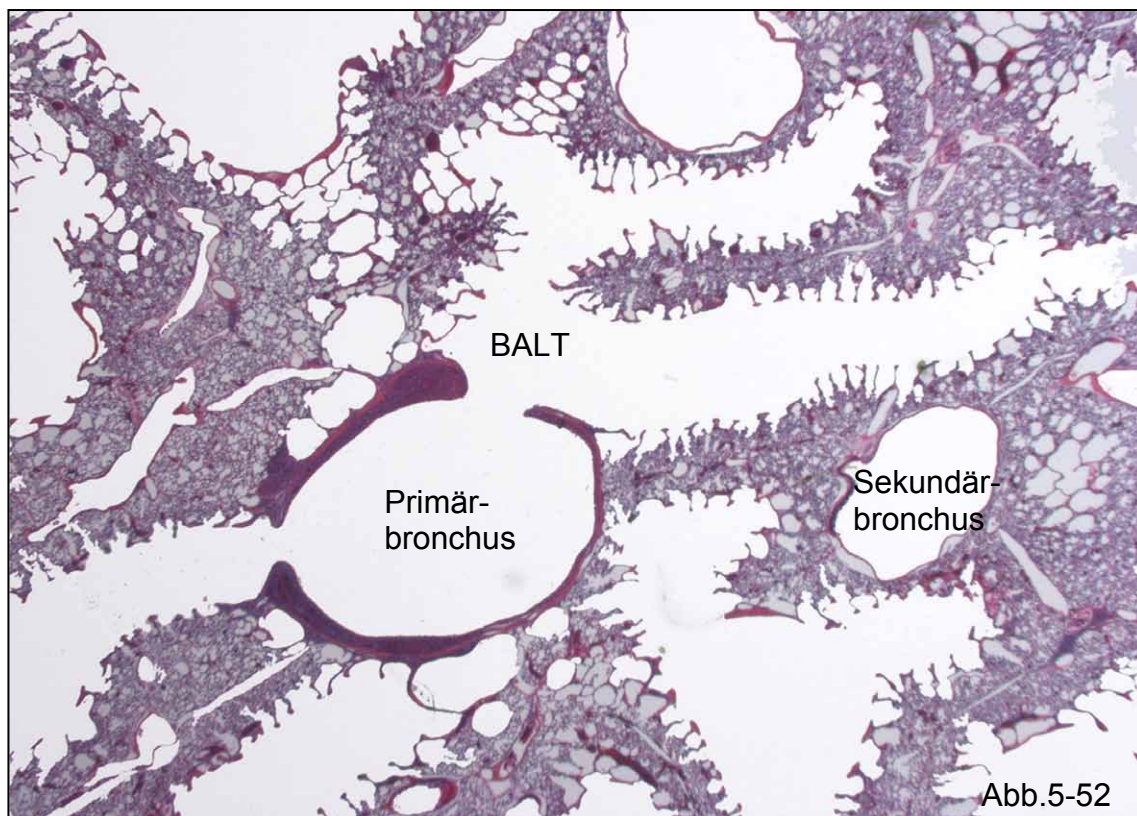


Abb.5-52: Übersichtsaufnahme der Lunge, HE, 1,6-fach.

5.5.1 Allgemeine lichtmikroskopische Befunde der Lunge

Das luftleitende System der Vögel unterscheidet sich erheblich von demjenigen der Säuger. Einzige Gemeinsamkeit ist die Teilung der Trachea in zwei Primärbronchen, welche die Luft in die Lungenflügel leiten. Beim Vogel treten die Primärbronchen medioventral in die Lunge

ein und durchziehen sie in ihrer gesamten Länge, bevor sie über das Ostium abdominale mit dem abdominalen Luftsack in Verbindung treten.

Insgesamt gehen von den Primärbronchen vier Gruppen von Sekundärbronchen ab. Als erste Gruppe entspringen vier Bronchi medioventrales aus der Dorsalwand des Primärbronchus. Es folgen sieben bis zehn Bronchi mediodorsales (307, 308) und vier bis sieben Bronchi lateroventrales, deren Abgänge sich gegenüberliegen. Aus der Lateralwand des hinteren Teils des Primärbronchus geht noch eine vierte Gruppe von Sekundärbronchen ab, die Bronchi laterodorsales, die sich im so genannten Neopulmo verzweigen. Die Parabronchen, die auch als Lungenpfeifen bezeichnet werden, nehmen ihren Ursprung wiederum von den einander zugekehrten Flächen der Sekundärbronchengruppen. Sie vernetzen sich und verbinden Medioventro- und Mediodorsobronchen miteinander (309). Der Gasaustausch findet in den Luftkapillaren statt, welche die Parabronchen rundherum besetzen. Diese weisen einen meist regelmäßigen, hexagonalen Bau auf und werden voneinander durch versorgende Gefäße enthaltende Bindegewebslagen getrennt (310). Die sechseckige Struktur der Parabronchen ermöglicht eine optimale Dichte, das Lumen der Parabronchen ist jedoch rund. Ihm folgen peripher große und tiefe Räume, die von Duncker als Atrien bezeichnet wurden (310). Die einzelnen Atrien werden durch sehr dünne Septen voneinander getrennt. Folgt man den Atrien weiter in die Peripherie, so gelangt man in die Infundibula, von denen wiederum die Luftkapillaren entlassen werden. Sie verbinden sich untereinander in alle Richtungen und bilden so ein dichtes Netzwerk, welches wiederum vom Netzwerk der Blutkapillaren durchwoben wird (310). Die Blut-Gas-Barriere wird dabei wie beim Säuger vom Endothel, der Basalmembran und den Epithelzellen gebildet.

5.5.1.1 Primärbronchus

Trachea, Primärbronchen und die Anfangsabschnitte der Sekundärbronchen besitzen ein einschichtiges, mehrreihiges Epithel. Da es auffällige Zilien trägt, wird es zum Teil auch als Flimmerepithel bezeichnet. Besonders im proximalen Drittel der Primärbronchen kamen in unseren Proben auch einige wenige intraepitheliale Becherzellen vor. Diese fielen insbesondere durch ihre Größe (durchschnittlich ca. 15,0 x 18,0 µm) und ihr grob strukturiertes, zahlreiche Granula enthaltendes Zytoplasma auf. Der Bereich direkt oberhalb der Becherzellen war stets frei von Zilien.

5.5.1.2 Sekundärbronchus

Das Epithel der Sekundärbronchen ging kontinuierlich aus dem beschriebenen Epithel der Primärbronchen hervor. Die Epithelzellen erwiesen sich dabei in allen untersuchten Präparaten als zunächst quadratisch oder stark abgeplattet. Im weiteren Verlauf nahmen sie wieder an Höhe zu, so dass sie als iso- bis hochprismatisch beschrieben werden konnten. Das Epithel besaß hier weder Zilien noch Becherzellen. Auch Follikel-assoziiertes Epithel (FAE, siehe unten) und BALT konnten im Sekundärbronchus in keinem der untersuchten Präparate gefunden werden. Sowohl die Tunica mucosa als auch die Tunica muscularis stellten sich in der mikroskopischen Untersuchung besonders dünn und unscheinbar dar.

5.5.1.3 Follikel-assoziiertes Epithel (FAE)

Das einschichtige FAE überzog das BALT und anliegende Strukturen im Primärbronchus. Im Gegensatz zu dessen Epithel wies es jedoch weder Becherzellen noch Zilien auf. Außerdem waren die FAE-Zellen anders als die in der Regel hochprismatisch geformten Epithelzellen des Primärbronchus flach bis quaderartig geformt. Lediglich an den äußersten Kanten des Primärbronchus waren sie wieder langgestreckt und hochprismatisch. Die direkten Übergänge zum Sekundärbronchus zeichneten sich durch besonders platte FAE-Zellen aus, die einem einschichtigen Plattenepithel ähnelten. Im Bereich des eigentlichen Sekundärbronchus vergrößerten sich diese Epithelzellen schnell wieder zu hochprismatisch geformten Zellen. Eine weitere Besonderheit waren die innerhalb des FAE lokalisierten Zellen. Es handelte sich dabei um eine recht kleine Population, die morphologisch den im BALT beschriebenen Zellen entsprach (siehe unten), so dass es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um Lymphozyten handelt.

5.5.1.4 Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe

Die ovalen BALT-Knoten waren an den Übergängen von Primär- zu Sekundärbronchen lokalisiert. Sie konnten vom umgebenden Gewebe gut abgegrenzt werden, da sie von einer lockeren Bindegewebskapsel umschlossen wurden. Die Versorgung erfolgte dabei durch einige wenige größere Blutgefäße. Meist ließen sich die BALT-Knoten in mehrere Einzelknoten unterteilen, innerhalb derer man ein oder mehrere Follikel erkennen konnte. Der durchschnittliche Durchmesser dieser Follikel betrug etwa 0,13 mm, variierte jedoch sehr stark. Die Zelldichte innerhalb des BALTs war relativ hoch, trotzdem konnte man die Morphologie der Einzelzellen recht gut beurteilen. Offensichtlich handelte es sich zum Großteil um Lymphozyten, da die Zellen sehr klein und rund geformt waren. Ihr

durchschnittlicher Durchmesser betrug ungefähr 5,0 µm, während der zentrale, runde Kern mit einer Kern-Plasma-Relation von bis zu 2:1 relativ gesehen sehr groß war. Das homogene Plasma bildete einen dünnen, perinukleären Ring.

5.5.1.5 Atrien

Das Epithel der Atrien in der Wandung der „Lungenpfeifen“ war ein einschichtiges, flaches bis isoprismatisches Epithel, nur an wenigen Stellen kamen vereinzelt auch hochprismatische Zellen vor. In verschiedenen Präparaten konnten intrazelluläre Einschlüsse beobachtet werden, was auf eine mögliche Phagozytoseaktivität des Atriumepithels schließen läßt. Eine wie im Primär- und Sekundärbronchus beobachtete Lamina propria mucosae und Tunica muscularis fehlten in den Atrien.

5.5.1.6 Interparabronchiales Bindegewebe

Das Lungenparenchym wurde aus den einzelnen Wandungen der Parabronchen -den Atria- gebildet, die sich als dicht verwobenes Zellsystem darstellten. In einzelnen Präparaten konnten einige wenige ins Parenchym eingestreute, großkernige, runde Zellen beobachtet werden. Da auch die übrigen morphologischen Kriterien denjenigen der im BALT beschriebenen Zellen entsprachen, handelte es sich vermutlich ebenfalls um Lymphozyten.

5.5.2 Zusammenfassung

Die folgende Tabelle gibt die Ergebnisse der histologischen Untersuchung wieder.

| | |
|---|---|
| Primärbronchus | Einschichtiges, mehrreihiges, zilientragendes Epithel mit einigen wenigen intraepithelialen Becherzellen (ca. 15,0 x 18,0 µm, grob strukturiertes Zytoplasma mit zahlreichen Granula) |
| Sekundärbronchus | Am Übergang zum Primärbronchus quadratische oder stark abgeplattete Epithelzellen, sonst iso- bis hochprismatisches Epithel, weder Becherzellen noch Zilien |
| FAE | Einschichtiges Epithel aus quaderförmigen oder flachen Zellen, überzog das BALT und anliegende Strukturen |
| BALT | Am Übergang Primär- u. Sekundärbronchus meist mehrere Einzelknoten mit ein oder mehreren Follikeln (Ø ca. 0,13 mm); hohe Zelldichte, Zellen rund, Ø etwa 5,0 µm, Kern rund, zentral, Kern-Plasma-Relation bis 2:1, homogenes Zytoplasma |
| Atrien | Einschichtiges, flaches bis isoprismatisches, vereinzelt hochprismatisches Epithel, z.T. intrazelluläre Einschlüsse |
| Interparabronchiales Bindegewebe | Dicht verwobendes Zellsystem, gebildet aus den Wandungen der Parabronchen; vereinzelt Zellen, die morphologisch den im BALT beschriebenen entsprechen |

Tabelle 5-5: Ergebnisse der histologischen Untersuchung der Lunge.

5.6 Immunhistologische Untersuchung der Lunge

Aus den weiter oben angeführten Gründen wurden auch für die immunhistologischen Untersuchungen Lungen von etwa zwölf Wochen alten Tieren verwendet. Es handelte sich dabei wie bei den HE-Färbungen um insgesamt fünf männliche und weibliche Hühner der Linie LSL. Im Rahmen der Auswertung wurden jeweils BALT, Parabronchuswand und das interparabronchiale Bindegewebe -also das Lungenparenchym- gesondert betrachtet. Der besseren Überschaubarkeit halber, nicht aus funktionellen Gesichtspunkten, wurde bei letzterem zum Teil auch zwischen Septen und Zwickeln differenziert. Unter einem parabronchialen bzw. atrialen Septum versteht man das Bindegewebe zwischen zwei benachbarten Parabronchen bzw. Atrien, beim Zwickel handelt es sich um den bindegewebigen, versorgende Gefäße enthaltenden Bereich zwischen drei zusammentreffenden Parabronchen.

5.6.1 Färbung mit dem mAk 16-6

Analog zu den Haut- und Bursaprobe wurde der Panleukozytenmarker 16-6 auch bei den Lungenproben in erster Linie als Positivkontrolle eingesetzt. Erwartungsgemäß waren annähernd alle Zellen im BALT CD45⁺, einschließlich der Zellen in den germinalen Zentren (**Abb. 5-53**). Lediglich in dem das BALT überziehenden FAE waren nur vereinzelte Leukozyten anzutreffen. Diese schienen mit einer durchschnittlichen Größe von ungefähr 6,5 x 7,0 µm eher klein zu sein. Dabei wiesen sie eine runde bis ovale Form auf und hatten einen großen, zentral gelegenen Kern. Die Kern-Plasma-Relation betrug etwa 2:1, das ringförmig um den Kern gedrängte Zytoplasma fiel weder durch eine granuläre noch durch eine ausgesprochen hyaline Struktur auf. Die direkt im BALT lokalisierten Zellen waren meist geringgradig kleiner, lagen aber mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 5,5 µm etwa in derselben Größenordnung. Auch die sonstigen morphologischen Kriterien waren vergleichbar, so dass man davon ausgehen kann, dass es sich in beiden Fällen um Lymphozyten handelt. Die Ergebnisse der Färbung mit dem mAk 16-6 bestätigen somit diejenigen aus der HE-Färbung.

Auch in den interatrialen Septen war die Anzahl die CD45⁺ Zellen relativ hoch (**Abb. 5-54**), wobei diese sich gleichmäßig auch über die tieferen Abschnitte der Parabronchuswand -die Infundibula und die Luftkapillaren- verteilten (**Abb. 5-55**). Bei den interatrial lokalisierten Zellen handelte es sich ihrer Morphologie nach zu schließen fast ausschließlich um Lymphozyten, während im perikapillären Bereich noch eine zweite, wenn auch deutlich

kleinere Subpopulation anzutreffen war. Diese Zellen waren mit durchschnittlich etwa $10,0 \times 12,5 \mu\text{m}$ deutlich größer und von rundlicher bis dreieckiger Form. Ihr ebenfalls rundlicher oder ovaler Kern wies eine Kern-Plasma-Relation von 1:1,5 bis 1:1 auf und lag peripher im feingranulären Zytoplasma.

Gelegentlich sah man auch einige diffus verteilte positive Zellen. Analog zu den interatrialen Septen konnte hier zwischen zwei verschiedenen Subpopulationen unterschieden werden, einer großen Lymphozyten- und einer wesentlich kleineren Makrophagenpopulation. Auch kleinere Aggregate wurden gelegentlich beobachtet, v.a. an den Firsten und an der Basis der Atrienwände. In diesem Fall handelte es sich jedoch fast ausschließlich um Lymphozyten. Neben diesen innerhalb der Parabronchen lokalisierten Leukozytenaggregaten fanden sich auch deutlich größere Zellansammlungen im interparabronchialen Bindegewebe, insbesondere in den Zwickeln in unmittelbarer Nähe größerer Blutgefäße. Auch in diesem Fall handelte es sich dem Aussehen der Zellen nach zu urteilen in erster Linie um eine Lymphozytenpopulation.

5.6.2 Färbung mit dem mAk KUL01

KUL01⁺ Zellen waren insgesamt nur relativ wenig vorhanden. So wurden im BALT nur vereinzelte positive Zellen v.a. unmittelbar perifollikulär angetroffen (**Abb. 5-56**). Zum Teil lagen sie auch in geringer Dichte diffus verteilt mit einem gewissen Abstand zu den Follikeln vor, während diese selbst annähernd negativ waren. Die betroffenen Zellen waren mit durchschnittlich $10,0 \times 11,0 \mu\text{m}$ mittelgroß bis groß, von runder bis dreieckiger Form und mit einem rundlichen, exzentrischen Zellkern ausgestattet. Die Kern-Plasma-Relation betrug etwa 1:1,5 bis 1:1, das Zytoplasma wies meist eine gewisse Granularität auf.

Eine weitere Lokalisation in der KUL01⁺ Zellen auftraten war die Parabronchuswand. Hier war das Gros dieser Zellen anzutreffen, wobei sie entweder diffus verteilt oder im Bereich der Luftkapillaren vorlagen (**Abb. 5-57**). Auch in den Zwickeln des interparabronchialen Bindegewebes des Lungenparenchyms konnten einige wenige KUL01⁺ Zellen detektiert werden. Anders jedoch als bei den Haut- oder Bursaprobeen ließen die positiven Zellen sich nicht in zwei unterschiedliche Subpopulationen unterteilen, sondern wiesen immer die gleiche, an Makrophagen erinnernde Morphologie auf.

5.6.3 Färbung mit dem mAk LD42

Die MHC II exprimierenden Zellen ließen sich bei den Lungenproben mit dem mAk LD42 etwas spezifischer anfärben als mit dem mAk 2G11. Im Folgenden soll daher nur noch auf ersteren Antikörper Bezug genommen werden.

Interessanterweise war die Anzahl der MHC II⁺ Zellen im BALT, welches in erster Linie von Lymphozyten gebildet wird, sehr gering. Die Menge und Verteilung der MHCII⁺ Zellen entsprach dabei in etwa derjenigen der KUL01⁺ Zellen. So waren die positiven Zellen diffus verteilt oder unmittelbar perifollikulär lokalisiert, während intrafollikulär keine positiven Reaktionen ausgemacht werden konnten (**Abb. 5-58**). Die durchschnittliche Größe der Zellen lag mit ca. 9,5 x 10,5 µm in derselben Größenordnung wie die der KUL01⁺ Zellen und auch die anderen morphologischen Kriterien wie Kerngröße, -form und -lage oder Zytoplasmastruktur waren vergleichbar, so dass es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um Zellen aus der Linie der Monozyten/Makrophagen handelt.

Ebenfalls analog zu den KUL01⁺ Zellen waren die MHC II⁺ Zellen in der Parabronchuswand etwas häufiger vertreten, insbesondere in den tieferen Abschnitten wie den Infundibula und den Luftkapillaren oder auch diffus verteilt (**Abb. 5-59**). Auch konnte bei der Färbung mit diesem Antikörper nicht wie bei den Haut- und Bursaproben zwischen zwei verschiedenen Subpopulationen differenziert werden. Was die interatrialen Septen und bindegewebigen Zwickel anbelangt, so fand sich hier stets eine mehr oder weniger unspezifische Braunfärbung. Dass das zwischen dem BALT und dem restlichen Lungengewebe befindliche Bindegewebe ebenfalls regelmäßig braun gefärbt war, bestätigte dabei das vermutete Vorkommen einer unspezifischen Kreuzreaktion eines Bindegewebeantigens mit dem verwendeten Antikörper.

5.6.4 Färbung mit dem mAk 3-6

Im Gegensatz zu den bisher dargestellten Antikörpern reagierten im BALT sehr viele Zellen mit dem mAk 3-6. Dabei war die Anzahl der positiven Zellen insbesondere in den Follikeln sehr hoch (**Abb. 5-60**), verschiedene Subpopulationen konnten jedoch nicht unterschieden werden. Die Zellen waren mittelgroß (durchschnittlich ca. 7,5 x 10,5 µm) und fielen vor allem durch ihre unregelmäßige, polygonale Form auf. Der oval geformte Zellkern war von kleiner bis mittlerer Größe und wurde meist in der Peripherie des homogenen Zytoplasmas angetroffen. Deutliche Zellfortsätze waren zwar nicht zu erkennen, aufgrund der recht hohen Zelldichte und der zweidimensionalen Darstellung kann das Auftreten solcher Ausläufer aber

auch nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Das FAE enthielt keine 3-6⁺ Zellen, neigte jedoch zu einer unspezifischen Braunfärbung.

Auch in der Parabronchuswand kamen relativ viele positive Zellen vor, wobei sie deren tiefere Abschnitte zu bevorzugen schienen (**Abb. 5-61**). Mit durchschnittlich 6,0 x 9,0 µm waren diese Zellen nur geringgradig kleiner als die im BALT beschriebenen. Auch Kerngröße, Kernform und Struktur des Zytoplasmas waren vergleichbar, der Umriss der in der Parabronchuswand stationierten Zellen war jedoch wesentlich regelmäßiger, meist oval und ließ keinerlei Anzeichen von Fortsätzen erkennen. Ähnliche Zellen fanden sich in kleinerer Menge auch diffus im Gewebe verteilt.

In den interparabronchialen Septen und den Zwickeln wurden ebenfalls regelmäßig 3-6⁺ Zellen gesehen. Sie waren mit etwa 7,5 x 12,5 µm ebenfalls mittelgroß und meist länglich-oval geformt. Der ovale, eher kleine Zellkern lag in der Peripherie des homogenen Zytoplasmas, so dass die Zellen diesbezüglich morphologisch nicht von den bisher beschriebenen Verhältnissen abwichen.

Auffallend war weiterhin die verhältnismäßig große Anzahl 3-6⁺ Zellen in den Gefäßquerschnitten, gleichgültig ob es sich um größere Gefäße oder um die kleineren Ausläufer in den interparabronchialen Zwickeln handelte (**Abb. 5-62**). Zum Teil könnte es sich bei den betroffenen Zellen zwar um Lymphozyten handeln, da sie mit einem Durchmesser von ca. 5,5 µm recht klein, kreisrund geformt und mit einem extrem großen, runden Kern ausgestattet waren. Die Mehrheit von ihnen wies jedoch mit durchschnittlich 8,5 x 11,0 µm fast die doppelte Größe auf und war unregelmäßig, entweder mehr rundlich-oval oder mehr dreieckig geformt. Auch die ovalen Zellkerne waren hier wesentlich kleiner und lagen exzentrisch im tendenziell granulären Zytoplasma. Da keine Zellfortsätze zu erkennen waren, besteht die Möglichkeit, dass es sich bei dieser Population um Monozyten handelt, die über die Blutbahn ins (Lungen-)Gewebe gelangen, wo sie erst zu reifen Makrophagen ausdifferenzieren müssen.

5.6.5 Färbung mit dem mAk CVI-ChNL-68.1

Im BALT konnten unterhalb des FAE relativ viele CVI-ChNL-68.1⁺ Zellen nachgewiesen werden und auch in den Follikeln fanden wir regelmäßig positive Zellen (**Abb. 5-63**). Diese waren rundlich und erinnerten zumindest äußerlich stark an die weiter unten beschriebenen folliculären CVI-ChNL-74.3⁺ Zellen. So lag ihr durchschnittlicher Durchmesser bei ca. 6,0 µm, während der ganz ähnlich geformte Zellkern einen Großteil des homogenen Zellinneren einnahm. Einige der Zellen erinnerten auch mehr an Makrophagen. Sie waren

etwas größer, ebenfalls rundlich oder auch dreieckig geformt und hatten einen relativ gesehen kleineren Zellkern mit einer Kern-Plasma-Relation zwischen 1:1,5 und 1:1. Ihr Zytoplasma enthielt meist feinstrukturierte Granula. Insbesondere die subepithelial lokalisierten Zellen gehörten dieser Fraktion an.

Weitere Lokalisationen in denen regelmäßig größere Mengen positiver Zellen auftraten waren die tieferen Abschnitte der Parabronchuswand, hier vor allem die Bereiche der Infundibula und der Luftkapillaren (**Abb. 5-64**). In den bindegewebigen Zwickeln des Parenchyms formierten sich sogar regelrechte Aggregate (**Abb. 5-65**), während die atrialen Septen negativ waren. Zum Teil lagen positive Zellen auch nur diffus im Parenchym verteilt vor, ohne dass man sie einer bestimmten Struktur zuordnen konnte. Ein größeres Aggregat positiver Zellen fand sich peribronchial in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem Blutgefäß. Aufgrund der hohen Zelldichte innerhalb dieser Ansammlung konnte die Morphologie der Einzelzellen in diesem Fall jedoch nicht exakt ermittelt werden.

Auch intravaskuläre Zellen reagierten vereinzelt positiv. Sie entsprachen morphologisch den weiter oben beschriebenen, rundlichen, großkernigen Zellen. Im Allgemeinen lässt sich sagen, dass sich alle bisher erwähnten CVI-ChNL-68.1⁺ Zellen zu den beiden oben angesprochenen, teilweise schwer zu trennenden Subpopulationen zuordnen lassen.

5.6.6 Färbung mit dem mAk CVI-ChNL-74.2

Wenige bis mäßig viele CVI-ChNL-74.2⁺ Zellen konnten in ähnlichen Positionen detektiert werden wie die weiter oben beschriebenen MHC II⁺ Zellen, also insbesondere in den tieferen Abschnitten der parabronchialen Wand wie den Infundibular- und den Luftkapillarbereichen (**Abb. 5-66**), seltener auch diffus verteilt oder an der Basis der Atrien. Mit durchschnittlich 8,75 x 11,25 µm waren sie von mittlerer Größe. Die Form war rundlich-oval, manchmal auch mehr dreieckig, der in der Peripherie des feingranulären Zytoplasmas liegende Zellkern wies ebenfalls eine rundliche Form auf. Die Kern-Plasma-Relation betrug dabei zwischen 1:1,5 und 1:1, so dass die CVI-ChNL-74.2⁺ Zellen alle morphologischen Kriterien eines reifen Makrophagen erfüllten.

Auch in den interatrialen Septen (**Abb. 5-67**) und den Zwickeln des interparabronchialen Bindegewebes traten regelmäßig vereinzelte bis wenige positive Zellen auf, wobei es sich den morphologischen Gesichtspunkten nach zu urteilen aber nicht um Makrophagen handelte. So lag die Zellgröße zwar im mittleren Bereich, konnte aber aufgrund der extrem unregelmäßigen Form kaum exakt gemessen werden. Die eher kleinen Zellkerne dagegen

waren oft rund und lagen exzentrisch, während das Zytoplasma weder deutliche Zellfortsätze noch Granula erkennen ließ.

Das BALT schließlich war stets negativ, einschließlich der Follikel. Lediglich im ans BALT angrenzenden Bindegewebe kam es, ähnlich wie bei Färbung mit dem mAk LD42, zu unspezifischen Kreuzreaktionen mit einem unbekanntem Antigen.

5.6.7 Färbung mit dem mAk CVI-ChNL-74.3

Im BALT unserer Proben fanden wir regelmäßig CVI-ChNL-74.3⁺ Zellen (**Abb. 5-68**). Die Population war klein bis mäßig groß und konzentrierte sich fast ausschließlich auf die Follikel, in denen sie relativ homogen verteilt vorlag, während extrafollikuläre CVI-ChNL-74.3⁺ Zellen die Ausnahme waren. Im Großen und Ganzen ähnelten die positiven Zellen denjenigen im Follikelmark der Bursa. Auch sie waren mit einem durchschnittlichen Durchmesser von etwa 5,0 µm eher klein und von runder, manchmal ovaler Form. Der der Zellform angepasste Kern nahm einen Großteil des Zellinneren ein, das Zytoplasma war ebenfalls homogen und ließ keine Fortsätze erkennen.

Interessanterweise reagierten innerhalb der Parabronchuswand auch sämtliche Atriumepithelzellen stets äußerst spezifisch auf die Färbung mit dem mAk CVI-ChNL-74.3 (**Abb. 5-69**). Ihre Zellform war wie bereits beschrieben im Allgemeinen flach bis isoprismatisch, während hochprismatische Zellen die Ausnahme waren. Die runden Zellkerne waren im Bereich der Epithelbasis angesiedelt und variierten in der Größe zwischen mittelgroß und groß, je nach Form der entsprechenden Epithelzelle, das Zytoplasma schien zahlreiche, feine Granula zu enthalten. Die übrigen Strukturen der Parabronchuswand sowie das Lungenparenchym enthielten nur vereinzelte bis wenige CVI-ChNL-74.3⁺ Zellen, die entweder diffus verteilt oder im Bereich der interparabronchialen Septen angesiedelt waren (**Abb. 5-70**). Ob es sich dabei tatsächlich um aviäre FDCs handelte ist schwierig zu beurteilen, da die Zellen in keinsten Weise den in den Follikeln lokalisierten Zellen ähnelten. So waren sie zwar ähnlich geformt, wiesen aber einen wesentlich größeren Durchmesser von etwa 12,0 µm auf und auch der ovale Zellkern war relativ gesehen wesentlich kleiner und lag leicht exzentrisch im feingranulären Zytoplasma. Auf der anderen Seite wurde jedoch bereits eine Subpopulation großer, runder FDCs in der Medulla der Bursafollikel beschrieben (290). Daher ist nicht auszuschließen, dass es sich bei den aviären FDCs eventuell gar nicht um eine homogene, sondern um eine aus verschiedenen Subpopulationen zusammengesetzte Population handelt.

5.6.8 Negativkontrollen

Bei allen untersuchten Proben waren die Kontrollen stets vollständig negativ.

5.6.9 Zusammenfassung

In den folgenden Tabellen wurden die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung der Hühnerlunge zusammengefasst.

| | 16-6 | KUL01 | LD42 | 3-6 |
|----------------------------|--------------|--------------|-------------|------------|
| BALT | +++ bis ++++ | +/- | +/- | +++ |
| Parabronchiale Wand | ++ bis +++ | + | + | +++ |
| Parenchym | ++ bis +++ | + | - (?) | ++ |

Tabelle 5-6 a: Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung der Lunge.

| | CVI-ChNL-68.1 | CVI-ChNL-74.2 | CVI-ChNL-74.3 |
|----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| BALT | ++ bis +++ | - | + bis ++ |
| Parabronchiale Wand | ++ | + bis ++ | +++ |
| Parenchym | ++ | +/- bis + | +/- bis + |

Tabelle 5-6 b: Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung der Lunge.

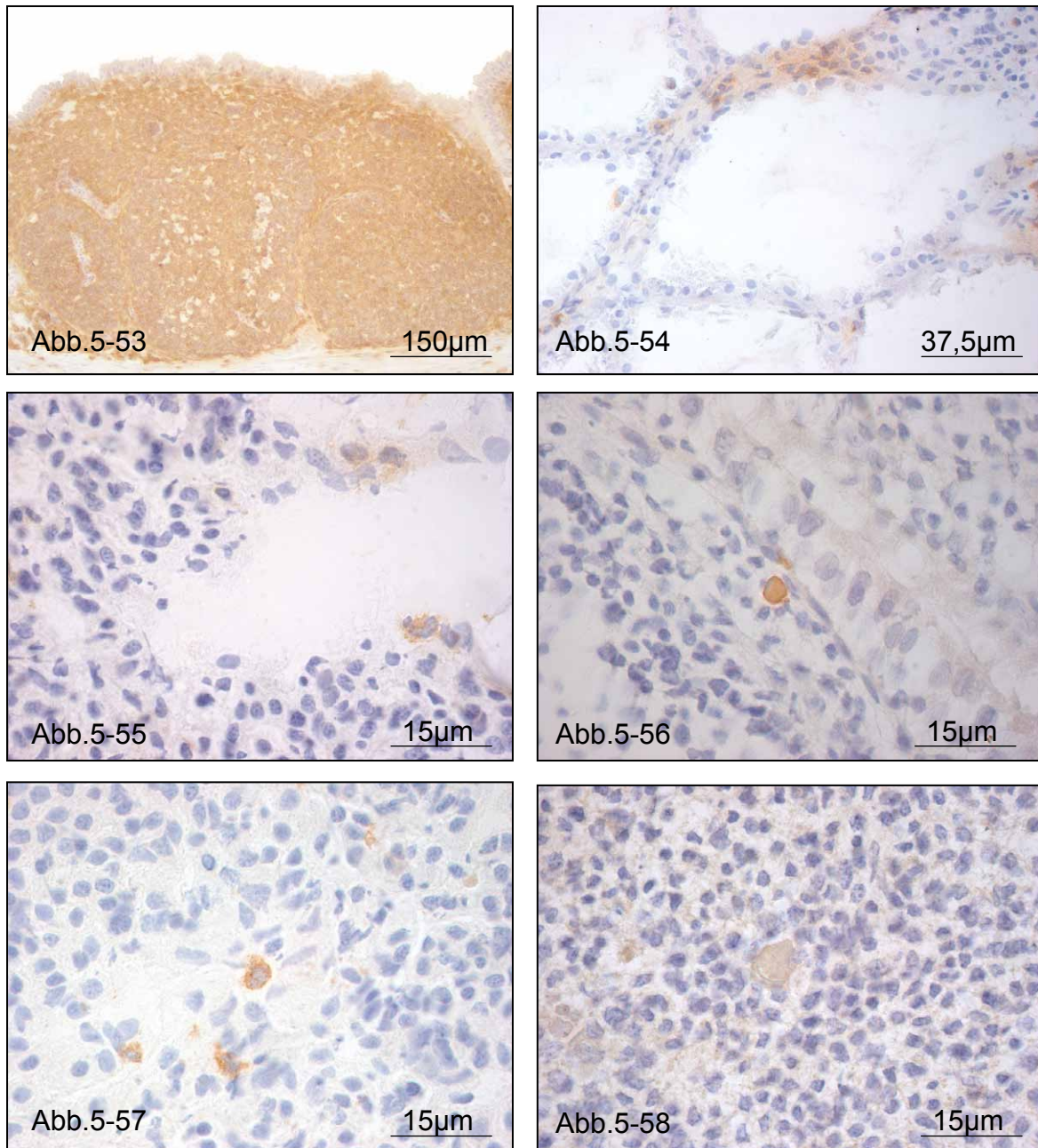


Abb. 5-53: Das BALT enthielt eine sehr große Anzahl CD45⁺ Zellen, lediglich im FAE traten diese nur vereinzelt auf.

Abb. 5-54 und 5-55: Im Parenchym wurden ebenfalls größere Mengen an CD45⁺ Zellen nachgewiesen, sowohl in den prox. Bereichen der Parabronchuswand (**Abb. 5-54**) als auch in der Tiefe (**Abb. 5-55**).

Abb. 5-56: Vereinzelt KUL01⁺ Zellen besiedelten das BALT, wo sie in den perifollikulären Bereichen angetroffen wurden.

Abb. 5-57: Die mit dem mAk KUL01 interagierenden Zellen fanden sich im Parenchym meist diffus verteilt oder im Bereich der Luftkapillaren.

Abb. 5-58: Ähnlich wie die KUL01⁺ Zellen waren die MHC II⁺ Zellen im BALT diffus oder unmittelbar perifollikulär verteilt.

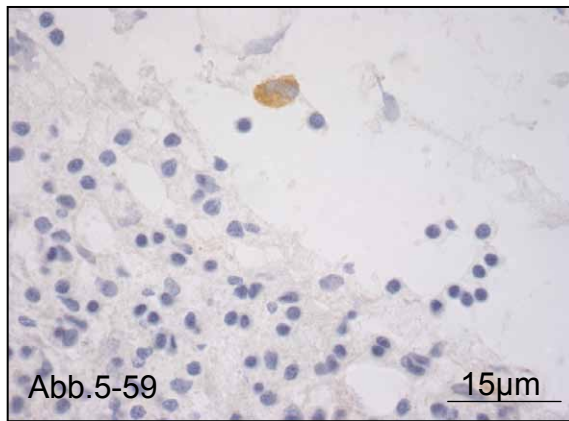


Abb.5-59

15µm

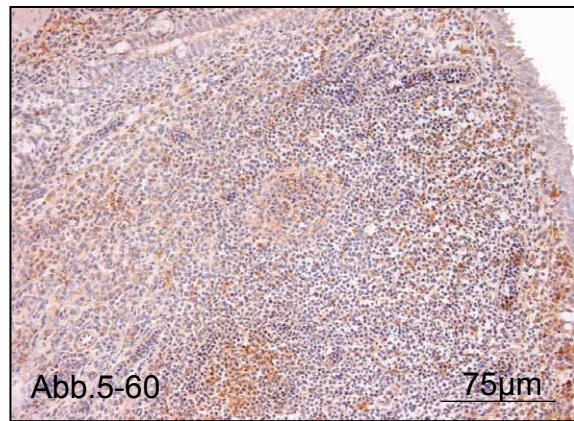


Abb.5-60

75µm

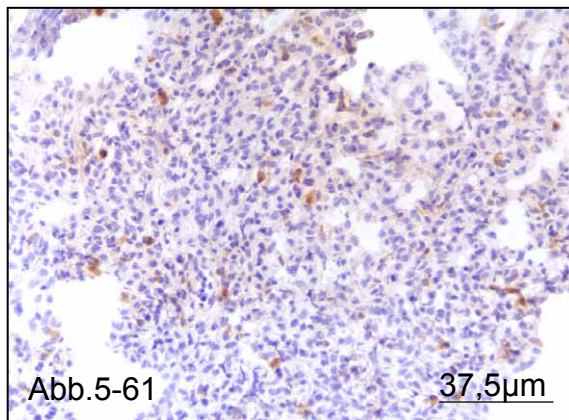


Abb.5-61

37,5µm

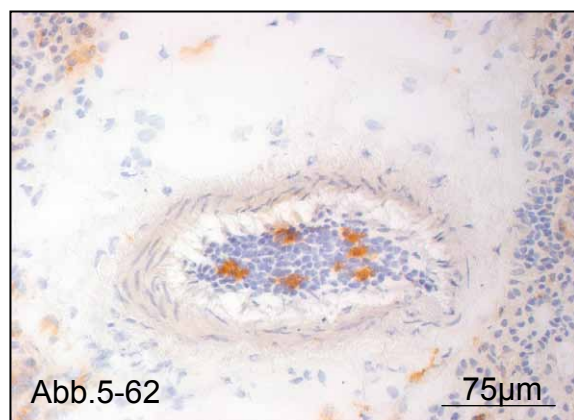


Abb.5-62

75µm

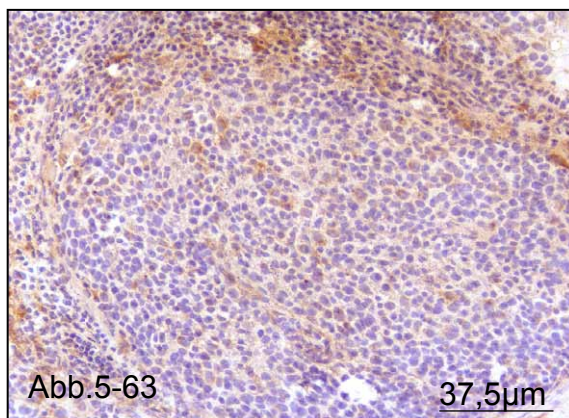


Abb.5-63

37,5µm

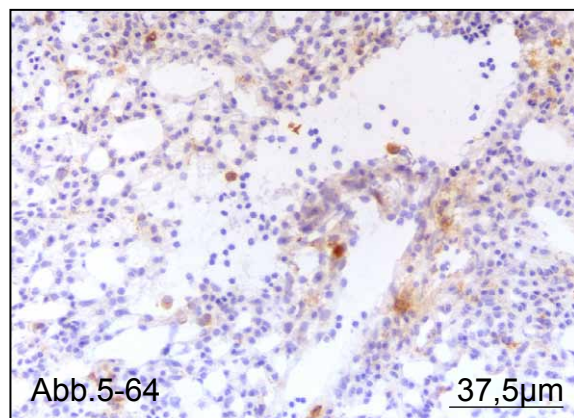


Abb.5-64

37,5µm

Abb. 5-59: Auch im Parenchym war die Verteilung von KUL01⁺ und MHC II⁺ Zellen vergleichbar (siehe **Abb. 5-56**).

Abb. 5-60: Im BALT waren 3-6⁺ Zellen recht häufig vertreten, wobei insbesondere die Follikel zahlreiche positive Zellen enthielten.

Abb. 5-61 und 5-62: Im Parenchym besiedelten die 3-6⁺ Zellen vor allem die tieferen Bereiche der Parabronchuswand (**Abb. 5-61**), eine nicht unerhebliche Anzahl positiver Zellen wurde aber auch intravaskulär angetroffen (**Abb. 5-62**).

Abb. 5-63: CVI-ChNL-68.1⁺ Zellen fanden sich im BALT vor allem unterhalb des Follikel-assoziierten Epithels sowie direkt in den Follikeln.

Abb. 5-64: Weitere von den CVI-ChNL-68.1⁺ Zellen bevorzugte Lokalisationen waren die tieferen Abschnitte der Parabronchuswand, vor allem die Infundibula und der Bereich der Luftkapillaren.

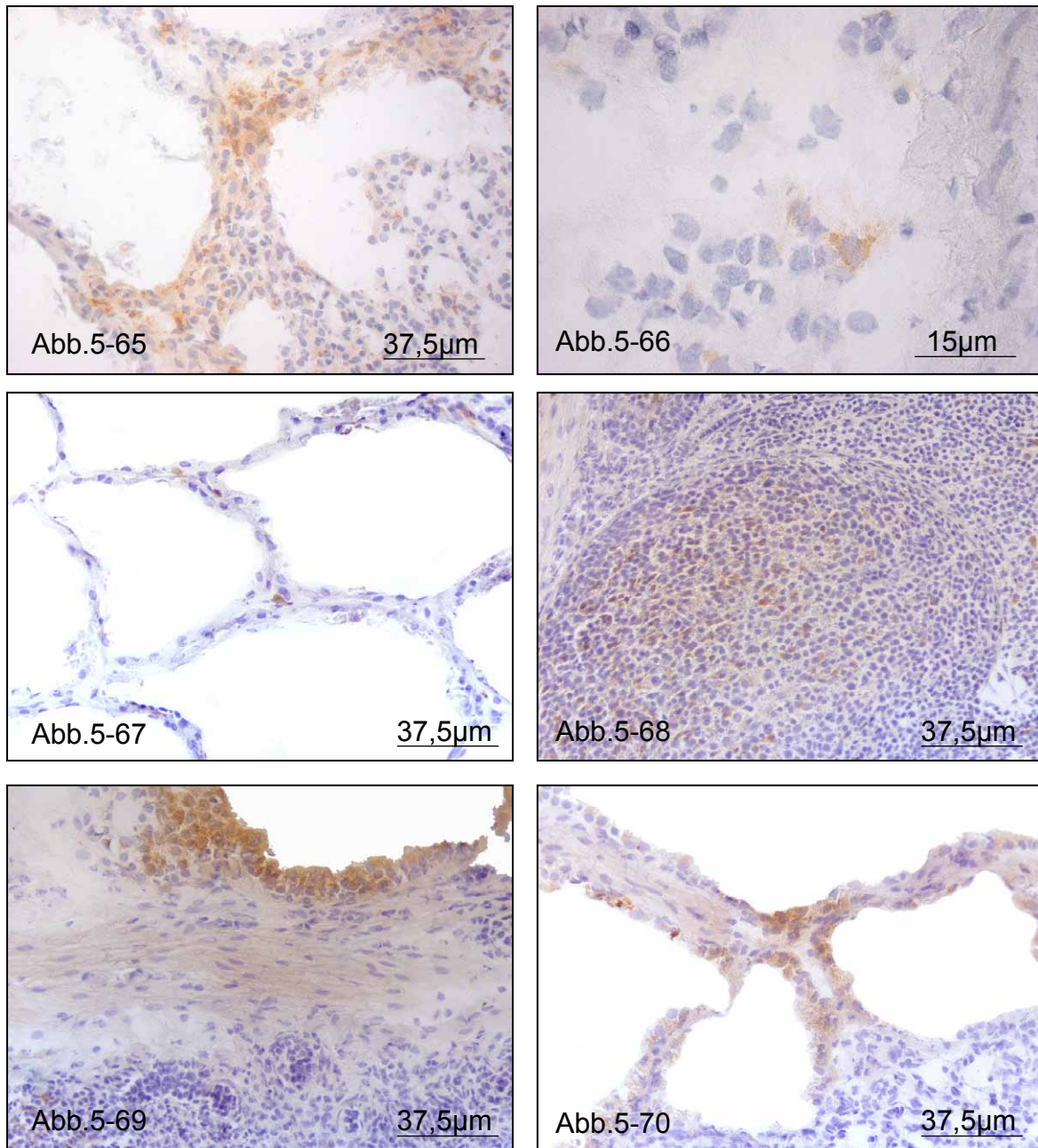


Abb. 5-65: Regelrechte Aggregate CVI-ChNL-68.1⁺ Zellen traten im interparabronchialen Bindegewebe auf.

Abb. 5-66: Im Parenchym reagierten nur relativ wenige Zellen positiv auf Färbung mit dem mAk CVI-ChNL-74.2. Sie befanden sich insbesondere in den tiefen Abschnitten der Parabronchuswand.

Abb. 5-67: Eine weitere von den wenigen CVI-ChNL-74.2⁺ Zellen bevorzugte Lokalisation stellten die interatrialen Septen dar.

Abb. 5-68: Die kleine bis mäßig große Population CVI-ChNL-74.3⁺ Zellen im BALT konzentrierte sich fast ausschließlich auf die Follikel.

Abb. 5-69: Interessanterweise reagierten auch stets sämtliche Zellen des Atriumepithels äußerst spezifisch auf Färbung mit diesem mAk.

Abb. 5-70: Vereinzelt CVI-ChNL-74.3⁺ Zellen befanden sich im Bereich der interparabronchialen Septen.

6 DISKUSSION

6.1 Struktur der Hühnerhaut

Die Haut repräsentiert nicht nur eines der größten Organe des Organismus, sondern stellt auch aufgrund ihrer zahlreichen verschiedenen Funktionen eine Besonderheit dar. Da die einzelnen Regionen völlig unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen, werden bei der Untergliederung der Haut in verschiedene Schichten daher neben morphologischen Kriterien auch funktionelle Aspekte berücksichtigt.

So dient die durch Faszien begrenzte und an speziellen Fettdepots (*Corpora adiposa*) sowie locker angeordneten Bindegewebsfasern reiche Subkutis in erster Linie als Energiespeicher und Verschiebeschicht (301). Auch an der Thermoregulation ist die Unterhaut beteiligt, da sie als Isolierschicht den Organismus vor übermäßiger Auskühlung schützt. Beim Säuger, insbesondere bei den Primaten, spielt die Epidermis ebenfalls eine wichtige Rolle hinsichtlich des Wärmehaushalts, da sie kleine, ekkrine Schweißdrüsen (*Glandulae glomiformes*) enthält, die durch die Verdunstungskälte ihres ausgesonderten wässrigen Sekrets eine Überhitzung des Körpers verhindern. Vögel jedoch besitzen keinerlei Schweißdrüsen. Die Funktion der Epidermis bezüglich der Thermoregulation scheint bei ihnen eher im Gegenteil auf einem nach außen gerichteten Verdunstungsschutz zu basieren. Ein weiterer Unterschied in der Epidermis von Vögeln und Säugern liegt darin, dass Talgdrüsen bei Vögeln nicht über die gesamte Körperdecke verteilt auftreten, sondern nur an ganz bestimmten Lokalisationen, nämlich als Bürzeldrüse, im äußeren Gehörgang und in der Kloake. Beide Tierklassen weisen aber zahlreiche sensible, epidermale Nervenfasern auf, so dass ihre Haut ihrer wichtigen Funktion als Sinnesorgan gerecht werden kann. Auch die Versorgung der Epidermis ist bei beiden Tierklassen analog. Da die Oberhaut selbst keine Blutgefäße enthält, wird sie von der darunter liegenden Lederhaut versorgt. Die auffälligste Besonderheit der Vogelhaut ist das charakteristische Federkleid oder Gefieder. Es dient neben dem passiven Wärmeschutz als Kommunikationsfläche für Artgenossen und Artfremde und ermöglicht den Vögeln überhaupt erst das Fliegen (311). Die für die Belange dieser Arbeit wichtigste Funktion der Haut ist jedoch ihre Barrierefunktion gegenüber sämtlichen Einflüssen aus der Umwelt, seien diese biologischer, chemischer oder physikalischer Natur (312, 313). Dabei existieren unterschiedliche Schutzmechanismen für unterschiedliche Belange. Beim Säugetier wird durch die saure Reaktion des wässrigen Schweißdrüsensekrets eine mikrobiostatische Wirkung erzielt. Man spricht in diesem Zusammenhang auch vom so genannten Säureschutzmantel. Da Vögel jedoch über keine Schweißdrüsen verfügen, sind sie in erster

Linie auf mechanische Schutzmechanismen angewiesen, um exogene Einflüsse abzuwehren. Besonders eindrucksvoll kann man dies anhand der unterschiedlichen Hautdicken in befiederten und unbefiederten Arealen beobachten. So wies die befiederte Haut der in dieser Arbeit untersuchten Proben eine Gesamtdicke von durchschnittlich lediglich etwa 13,0 μm auf, während die sehr viel stärker exponierte dorsale Schuppenhaut des Tarsometatarsus mit durchschnittlich 150,0 μm fast 12 mal so dick war (vgl. **Abb. 5-1**, **Abb. 5-2** und **Tabelle 5-1**). Aber auch innerhalb der verschiedenen unbefiederten Regionen existierten Unterschiede. So betrug die Dicke der Kehllappenhaut mit ungefähr 70,0 μm nicht einmal die Hälfte derjenigen der Schuppenhaut. Allerdings dient die Kehllappenhaut in erster Linie als Kommunikationsfläche für Artgenossen und ist, obwohl ebenfalls federlos, Umweltantigenen und Pathogenen in wesentlich geringerem Umfang ausgesetzt als die in unmittelbarem Kontakt zum Untergrund stehende Schuppenhaut. Diese stellt den bevorzugten Aufenthaltsort für die zur Familie der Laelaptidae gehörende blutsaugende rote Vogelmilbe *Dermanyssus gallinae* dar, um nur ein Beispiel für die zahlreichen Umweltfaktoren zu nennen denen die Schuppenhaut ausgesetzt ist. Es deutet daher alles darauf hin, dass die Hautdicke direkt mit der Umweltexposition korreliert ist, so dass stets eine ausreichende mechanische Schutzfunktion gewährleistet werden kann. Dabei spielt jedoch nicht nur die Gesamtdicke der Epidermis eine wichtige Rolle, sondern auch das Verhältnis epidermaler Matrix zur Hornschicht bietet wertvolle Hinweise. So lag es bei der befiederten Haut bei etwa 3:1, bei der unbefiederten Kehllappenhaut zwischen 1:1 und 2,5:1, bei der dorsalen Schuppenhaut jedoch zwischen 0,3:1 und 0,5:1. Je höher die Belastungen also sind, denen ein bestimmtes Hautareal ausgesetzt ist, umso stärker ausgeprägt ist auch sein Stratum corneum, ein Effekt der im Übrigen auch beim Säugetier schon seit langem bekannt ist. Hinsichtlich dieses Aspekts scheint die Haut der Kehllappen eher mit der befiederten Haut vergleichbar zu sein als mit der Schuppenhaut. Auch auf immunhistologischer Ebene bestanden zum Teil größere Analogien zwischen Kehllappen- und befiederter Haut als zwischen den beiden unbefiederten Hautarealen, ein Gesichtspunkt auf den im nächsten Kapitel noch ausführlicher eingegangen werden soll.

6.2 Myeloide Zellen in der Hühnerhaut

Um den unterschiedlichen an sie gestellten Anforderungen gerecht zu werden, wird die Haut von zahlreichen, sehr unterschiedlichen Zellarten gebildet bzw. besiedelt. Im Einzelnen handelt es sich dabei um Keratinozyten, Fibroblasten, dendritische Zellen, Makrophagen, Mastzellen sowie vereinzelte infiltrierende B- und T-Lymphozyten.

In der Abwehr von Pathogenen spielen dabei insbesondere die Immunzellen der Haut eine entscheidende Rolle, wobei der Schwerpunkt in dieser Arbeit auf die Immunzellen myeloiden Ursprungs gelegt wurde, welche ausnahmslos der unspezifischen Abwehr zugerechnet werden. Im Falle der professionell Antigen-präsentierenden Zellen wie den Makrophagen oder vor allem den dendritischen Zellen spricht man zum Teil auch von einer Vermittlerfunktion, da beim Säuger bekannt ist, dass sie nicht nur angeborene Abwehrmechanismen initiieren, sondern auch als Bindeglied zwischen der unspezifischen und der spezifischen Abwehr fungieren. So verarbeiten Langerhans Zellen epikutane Protein-Antigene, migrieren aus der Epidermis und präsentieren die antigenen Peptide zusammen mit MHC II-Molekülen entweder in der Haut oder in der Parakortex regionaler Lymphknoten an die korrespondierenden T-Lymphozyten (314).

Bei nicht-säugenden Wirbeltieren im Allgemeinen und auch bei Hühnern im Besonderen sind bislang jedoch nur wenige Studien durchgeführt worden, um die Existenz Langerhans-ähnlicher Zellen in der Haut zu demonstrieren. Carillo-Fargo et al. konnten zwar ATPase⁺ Zellen in der Epidermis von Ochsenfröschen und Hühnern nachweisen (272) und zeigen, dass diese Zellen Birbeck-Granula enthalten und auf ihrer Oberfläche MHC II-Moleküle exprimieren (274). Über die Morphologie und Verteilung anderer Immunzellen myeloiden Ursprungs in der Hühnerhaut existierten bislang jedoch kaum Daten, Veröffentlichungen über die Unterschiede innerhalb der verschiedenen Hautareale fehlen ganz.

Bei den im Zusammenhang mit dieser Arbeit immunhistologisch untersuchten Hautproben war insbesondere die große Anzahl dermalen Leukozyten erstaunlich. Ersichtlich war dies an den in allen drei untersuchten Hautregionen regelmäßig und zahlreich auftretenden CD45⁺ Zellen. Dabei handelte es sich fast ausschließlich um Zellen myeloiden Ursprungs, da gegen B- oder T-Lymphozyten gerichtete Antikörper nur in Einzelfällen zu positiven Reaktionen führten und sich die betroffenen Zellen oftmals nicht in der Haut selbst, sondern lediglich in den die Haut versorgenden dermalen Blutgefäßen befanden. Ein entscheidender Unterschied zur murinen, nicht jedoch zur humanen Haut bestand in der vollständigen Abwesenheit der dendritisch geformten intraepithelialen γ/δ T-Zellen (315, 316) Bei diesen T-Lymphozyten handelt es sich um eine spezielle Zellform, die im Gegensatz zur Mehrheit der an der erworbenen Immunantwort beteiligten T-Zellen keine α/β sondern γ/δ Rezeptoren exprimiert, welche durch eine äußerst geringe Variabilität gekennzeichnet sind.

Die zahlreichen Leukozyten in der Hühnerhaut verteilten sich jedoch nicht gleichmäßig über alle Schichten der Haut. Die Dermis sowie das perivaskuläre Bindegewebe enthielten zwar regelmäßig in allen untersuchten Regionen zahlreiche CD45⁺ Zellen, im subepidermalen

Bereich waren es jedoch schon deutlich weniger positive Zellen, insbesondere in den befiederten Regionen sowie in der Kehllappenhaut. Letztere enthielt auch keine epidermalen Zellen, während solche in der dorsalen Schuppenhaut zumindest in geringer Zahl auftraten. Die Epidermis der befiederten Bereiche schien ebenfalls frei von CD45⁺ Zellen zu sein, allerdings wurde die Auswertung in diesem Fall aufgrund des extrem geringen Durchmessers der Haut erheblich erschwert. Den morphologischen Kriterien nach zu urteilen handelte es sich bei den epidermalen Zellen, die meist lokal konzentriert in oder dorsal der Basalzellschicht lokalisiert waren, um Makrophagen. So waren sie mit durchschnittlich ca. 11,25 x 13,75 µm relativ groß, von rundlich-ovaler bis dreieckiger Form und mit einem mittelgroßen, exzentrischen Kern und feingranulärem Zytoplasma ausgestattet. Soweit es anhand von Morphologie und Verteilung der Zellen beurteilt werden kann, exprimierten der Großteil der epidermalen Makrophagen auch MHC II-Moleküle und war KUL01⁺ CVI-ChNL-68.1⁺.

Besondere Aufmerksamkeit verdienen auch die subepidermalen Zellaggregate, die sich regelmäßig in den direkt unter den epidermalen CD45⁺ Zellen liegenden Dermisabschnitten bildeten. Offensichtlich handelte es sich bei den die Aggregate bildenden Zellen um zwei unterschiedliche Subpopulationen. Die eine ähnelte sehr stark den oben beschriebenen epidermalen Makrophagen. Die zweite Subpopulation wies jedoch eine völlig andere, eher dendroide Morphologie auf. Die betroffenen Zellen waren lang und schmal, selten breiter als 2,0 µm bei einer Länge von bis zu 14,5 µm. Der Kern war der Zellform angepasst und wurde meist mehr oder weniger peripher im homogenen Zytoplasma angetroffen. Die „Enden“ des Somas wirkten sehr fein und schmal, ob es sich aber tatsächlich um Zytoplasmafortsätze handelte war auf lichtmikroskopischem Niveau nicht eindeutig zu klären. Die Aggregate waren dabei nicht nur auf den subepidermalen Bereich beschränkt, sondern traten in allen untersuchten anatomischen Regionen in allen Schichten des Koriums auf. In der Literatur wurden entsprechende Verteilungsmuster von ATPase⁺ CD45⁺ Vimentin⁺ Langerhans Zellen sowohl beim Menschen (317) als auch bei der Maus (318) beschrieben. Die funktionelle Bedeutung dieser Muster ist jedoch noch nicht bekannt. Eventuell finden hier Reifungsvorgänge statt, wobei unter Umständen auch die sich im Bereich der Zellansammlungen befindenden Keratinozyten eine wichtige Rolle hinsichtlich der Produktion von Zytokinen und/oder Chemokinen spielen. Morphologie und Verteilung der beschriebenen CD45⁺ Subpopulation, zusammen mit der positiven Reaktion auf den von Mast et al. als Marker für LCs beschriebenen mAk KUL01 (292) legen daher den Schluss nahe, dass es sich in diesem Fall tatsächlich um epidermale DCs handelt. Zumindest in der

Schuppenhaut des Tarsometatarsus lieferte auch die Lokalisation zahlreicher der Konglomerate direkt unterhalb der epidermalen CD45⁺ Zellen einen wichtigen Hinweis darauf, dass von eventuell aktivierten, epidermalen Makrophagen freigesetzte Chemokine die Anlockung weiterer Makrophagen und dendritischer Zellen aus dem darunterliegenden Korium bewirken könnten.

Obwohl die Makrophagen und die dendritischen Zellen zu etwa gleichen Teilen in den Aggregaten, dem perivaskulären Bindegewebe und den meisten Regionen der Dermis vertreten waren, handelte es sich bei den direkt subepidermal lokalisierten Zellen fast ausschließlich um die schmalen, dendroid geformten Zellen. Dass dabei keine morphologischen Unterschiede zwischen diesen Langerhans-ähnlichen Zellen und den weiter in der Tiefe des Koriums lokalisierten dendroiden Zellen festzustellen waren, sollte nicht überbewertet werden, da die Lokalisation der LCs schließlich auch beim Säuger nicht strikt auf den epidermalen Bereich beschränkt ist, sondern es im Zuge der verschiedensten exogenen Einflüsse zu Migrationsvorgängen kommt, welche wiederum essentiell für die Reifung der LCs zu sein scheinen (15). So erkannte der bereits erwähnte mAk KUL01 neben den Langerhans-ähnlichen Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft zum Stratum basale und in den subepidermalen Aggregaten auch Zellen mit dendritischer Erscheinung in den übrigen Bereichen des Koriums. In der Literatur wurden ebenfalls KUL01⁺ Zellen in der Hühnerhaut beschrieben, wobei jedoch im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit nicht zwischen verschiedenen Subpopulationen differenziert wurde. Es war nur von positiven Zellen mit dendritischer Erscheinung und granulärem Farbmuster die Rede. Diese sollen weiterhin durch die Expression von MHC II-Molekülen gekennzeichnet und sowohl in der Dermis als auch in der Epidermis lokalisiert gewesen sein (292). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen dabei zwar die Expression von MHC II-Molekülen, nicht jedoch die granuläre Struktur des Zytoplasmas. Eventuell ist die Ausbildung von Granula auch mit dem Reifegrad der Zellen oder mit der Stärke der Antigen-Exposition verbunden. Leider geht aus dem von Mast et al. (292) veröffentlichten Artikel jedoch weder das Alter der verwendeten Tiere noch die jeweils untersuchte anatomische Hautregion hervor.

Äußerst interessant im Zusammenhang mit dieser Färbung war auch, dass epidermale KUL01⁺ Makrophagen nur in der befiederten Haut nachgewiesen werden konnten, nicht aber in der Schuppen- oder der Kehllappenhaut. Alle anderen mit einem der getesteten Antikörpern reagierenden, epidermalen Zellen wurden stets in der unbefiederten Haut gefunden, so die CD45⁺ Zellen, die 3-6⁺ Zellen und die CVI-ChNL-68.1⁺ Zellen in der Schuppenhaut und die MHC II⁺ Zellen in der Schuppen- sowie der Kehllappenhaut. Dass auch die befiederte Haut

zum Teil epidermale Makrophagen enthielt, kann ein Hinweis darauf sein, dass in diesem speziellen Fall das betroffene Hautareal einer zwar unwahrscheinlicheren, aber durchaus möglichen erhöhten Antigenexposition ausgesetzt war. Dass es sich bei den betroffenen Zellen tatsächlich um Makrophagen handelte ist sehr wahrscheinlich, obwohl ihre Morphologie aufgrund des extrem geringen Durchmessers der Epidermis und der Tendenz der Zellen zur Zusammenballung sehr schwierig zu beurteilen war. Da jedoch fast alle anderen epidermalen Zellen in den unbefiederten Arealen anhand ihrer mittleren Größe von durchschnittlich ca. zwölf μm , der rundlichen oder dreieckigen Form, dem exzentrischen Kern und der Kern-Plasma-Relation von 1:1,5-1:1 morphologisch eindeutig als Makrophagen identifiziert werden konnten, kann davon ausgegangen werden, dass auch die epidermalen Zellen der befiederten Haut dieser Zellpopulation angehören. Die einzigen Zellen, die in diesem Zusammenhang nicht eindeutig eingeordnet werden konnten, waren die 3-6⁺ Zellen in der Epidermis der Schuppenhaut. Diese Zellen waren rundlich und mit durchschnittlich etwa 12,5 x 15,0 μm etwas größer als die meisten anderen epidermalen Zellen. Hauptunterschied war jedoch der oft zentral gelegene Zellkern und das homogene Zytoplasma. Vielleicht handelte es sich bei diesen Zellen um Makrophagenvorläufer, was zwar das Fehlen von Granula, nicht aber ihren großen Durchmesser erklären würde. Unter Umständen reagiert jedoch auch um eine völlig andere Zellpopulation mit dem mAk 3-6, was aufgrund des fehlenden Wissens über die Antigenpezifität dieses Antikörpers ebenfalls nicht ausgeschlossen werden kann.

Epidermale CVI-ChNL-68.1⁺ Zellen wurden in der Literatur, im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit, nicht beschrieben. Auch war leider nicht ersichtlich, welche Hautregionen untersucht worden sind. So konnten im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit epidermale CVI-ChNL-68.1⁺ Zellen nur in der Schuppenhaut nachgewiesen werden. Das Vorkommen von dendritisch geformten Zellen in der Dermis und insbesondere in dem die Blutgefäße umgebenden Bindegewebe dagegen stimmt vollkommen mit den bereits veröffentlichten Daten überein (294).

Neben der dendritisch geformten Population reagierten auch zahlreiche dermale Makrophagen positiv auf Färbung mit dem mAks CVI-ChNL-68.1, 16-6, KUL01, 2G11 und CVI-ChNL-74.2. Interessanterweise waren bei all diesen Antikörpern die in direktem Kontakt zur Basalmembran stehenden Bereiche fast ausschließlich von den Langerhans-ähnlichen Zellen besiedelt, lediglich beim mAk CVI-ChNL-68.1 schienen in diesem Bereich die Makrophagen zu überwiegen. Letzteres gilt jedoch nur für die Schuppenhaut. In der befiederten und in der Kehllappenhaut war zwar die Anzahl der subepidermalen CVI-ChNL-68.1⁺ Zellen

vergleichsweise gering, es konnten hier aber neben den dendritisch geformten Zellen keine weiteren Populationen ausgemacht werden. Auch die Tendenz zur Bildung subepidermaler und dermaler Aggregate sowie eine Präferenz der Zellen für die proximalen Bereiche des Koriums waren in erster Linie auf die Schuppenhaut beschränkt. Insbesondere die bevorzugte Lokalisation im Stratum superficiale der Schuppenhaut konnte man nicht nur bei Färbung mit dem mAk CVI-ChNL-68.1 beobachten, sondern auch bei den mAks 16-6, KUL01 und 2G11. Unter Umständen kann man dies als Indiz dafür werten, dass beispielsweise von aktivierten epidermalen Makrophagen gebildete, weitere unspezifische Abwehrzellen anlockende Chemokine eine um so größere Rolle spielen, je stärker der betroffene Hautabschnitt potentiell pathogenen Faktoren aus der Umwelt ausgesetzt ist.

Erwähnenswert ist schließlich auch das Färbeverhalten des mAk CVI-ChNL-74.2. Obwohl dieser Antikörper von Jeurissen et al. als negativ in der Haut beschrieben wurde (290), konnten im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit sowohl in der befiederten als auch in der unbefiederten Haut sehr spezifische Färbeergebnisse erzielt werden. Dass dabei im Korium zwei morphologisch unterschiedliche Zellarten detektiert werden konnten ist umso erstaunlicher, als dass der mAk CVI-ChNL-74.2 nur mit einer Subpopulation reifer Gewebemakrophagen interagieren soll. Die eine Population stach insbesondere durch ihre feinen Zytoplasmaausziehungen hervor (siehe **Abb. 5-37**). Es war im Übrigen auch die einzige CVI-ChNL-74.2⁺ Population, die in unmittelbarer Nachbarschaft zur Basalmembran angetroffen wurde, grundsätzlich besiedelte sie aber alle Schichten der Dermis. Die zweite Subpopulation setzte sich aus unregelmäßig geformten, polygonalen Zellen mittlerer Größe zusammen. Auch ihr Zytoplasma bildete Ausläufer, welche jedoch mehr konisch geformt waren (siehe **Abb. 5-36**). In den aus der Schuppenhaut stammenden Proben befanden sich dabei erheblich mehr Zellen in direktem Kontakt zur Basalmembran als in den beiden anderen untersuchten Regionen, und auch die Gesamtzahl der positiven Zellen war in der Schuppenhaut deutlich höher. Letzteres lässt sich wahrscheinlich durch die wesentlich stärkere Antigenexposition erklären, denen die Haut am Tarsometatarsus bzw. generell am Hühnerfuß ausgesetzt ist. Problematischer ist jedoch die Zuordnung der Zellen. Mit Ausnahme des mAk CVI-ChNL-68.1 ist bei den verwendeten CVI-ChNL-Antikörpern leider nicht bekannt, ob die korrespondierenden Antigene auf der Zelloberfläche und/oder im Zellinneren exprimiert werden, während sich die Antigene aller anderen untersuchten myeloiden Antikörper definitiv auf der Zelloberfläche befinden. Dies wiederum erschwert die exakte Beurteilung der Zellmorphologie, da die zugrunde liegende Farbreaktion nur im Bereich des gebundenen Antigens auftritt. Insbesondere die Aussage über das Vorhandensein,

die Form und die Länge von Zytoplasmaausläufern wird so erschwert. Gerade in Bezug auf die Färbung mit dem mAk CVI-ChNL-74.2 waren die morphologischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellpopulationen jedoch besonders frappant. Das Auftreten von Makrophagen überraschte dabei nicht, umso mehr aber das der beiden anderen eher dendritisch geformten Populationen. Eine dreidimensionale Darstellung der Zellen mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie ist zwingend erforderlich, um diesbezüglich noch weitere Hinweise zu gewinnen. Da das korrespondierende Antigen des verwendeten Antikörpers nicht bekannt ist, ist es durchaus möglich, dass neben reifen Gewebemakrophagen andere Reifestadien oder sogar Zellarten erkannt werden.

6.3 Lymphatisches System und Struktur der Bursa fabricii

Obwohl das lymphatische System der Vögel zahlreiche Parallelen zu demjenigen der Mammalier aufweist, existieren doch zum Teil auffallende Unterschiede. Die beiden offensichtlichsten sind einmal das weitgehende Fehlen organisierter Lymphknoten sowie die Ausbildung der Bursa fabricii/cloacalis als einzigartiger Prägungsstätte der B-Lymphozyten.

Was die Lymphknoten betrifft, so treten diese lediglich bei Sumpf- und Wasservögeln in Form von Hals- und Lendenlymphknoten auf, wobei der Aufbau dieser Lymphknoten in Form lymphoretikulärer Formationen dem der Reptilien und nicht dem der Säuger entspricht. Es handelt sich dabei um Konglomerate aus Lymphsinus und dazwischen liegenden lymphoretikulären Strängen, die sich wiederum aus diffusen T-Lymphozytenarealen und aus von B-Lymphozyten gebildeten Keimzentren zusammensetzen. Zwischen den zahlreiche Lymphozyten, Makrophagen und vereinzelte Erythrozyten sowie Granulozyten enthaltenden Lumina der Lymphsinus und den lymphoretikulären Strängen soll die Antigenvermittlung stattfinden.

Wie bereits erwähnt wurde die Funktion der Bursa als Prägungsstätte der B-Lymphozyten nur durch Zufall entdeckt, als man erkannte, dass bursektomierte Hühner nicht in der Lage waren Antikörper zu bilden (269, 319). Diese Arbeiten haben zur Entdeckung einiger grundlegender Mechanismen in der Entwicklung und Funktionsweise des Immunsystems geführt. So wurde die Dichotomie des erworbenen Immunsystems, d.h. für die zelluläre Immunität verantwortliche T-Zellen und die humorale Immunantwort vermittelnde B-Zellen, zunächst im Huhn beschrieben (306). Erst später, als das Knochenmark der Bursa als funktionelles Äquivalent zugeordnet werden konnte, wurde das Konzept der Dichotomie auf den Säuger übertragen (320, 321). Zu einem Großteil sind diese Entdeckungen natürlich auch der Tatsache zu verdanken, dass die Bursa wesentlich leichter zugänglich ist als das

Knochenmark und dass durch die embryonale Entwicklung im Ei die gesamte Ontogenese relativ einfach erforscht werden konnte (322, 323).

Was die Struktur der Bursa anbelangt, so konnte durch die HE-Färbungen die bereits bekannte Unterteilung des Organs durch epithelbedeckte Primärfalten sowie von diesen abgehenden Sekundär- und Tertiärfalten bestätigt werden (324, 325). Auch die Gliederung der in den zwischen den Sekundär- und Tertiärfalten enthaltenen Lobuli lymphatici in das zentrale relativ locker strukturierte Mark und die periphere, wesentlich kompaktere Rinde stimmten mit den bekannten Beschreibungen überein (324).

Hervorgehoben werden soll schließlich noch das spezifisch phagozytotische FAE (Follikel-assoziiertes Epithel), welchem auch im BALT der Lunge eine besondere Bedeutung zukommt. Es wird in der Bursa von den sich dorsal auf den Follikeln befindenden Epithelzellen gebildet, nachdem diese bestimmte, wahrscheinlich durch Lymphozyten induzierte Differenzierungsprozesse durchgemacht haben (326).

6.4 Myeloide Zellen in der Bursa fabricii

Exogene Antigene gelangen über den kurzen Bursastiel (*Collum bursae cloacalis*), welcher direkt mit dem Proktodaeum verbunden ist, ins Lumen der Bursa. Ermöglicht wird dieser Vorgang durch retrograde Bewegungen der Analmuskulatur (327). So konnte kolloidaler, auf die Anallippen aufgebracht Kohlenstoff schon zwei Stunden nach der Applikation in der Bursa nachgewiesen werden, wo er selektiv durch das FAE absorbiert wurde (328). Auch verschiedene andere lösliche Antigene gelangen auf diese Weise ins Bursaparenchym, während partikuläre Antigene zwar das Bursalumen erreichen, nicht aber vom FAE phagozytiert werden. Der Transport einer Substanz von der Kloake zum Bursalumen scheint daher ein relativ unspezifischer Prozess zu sein, während die Aufnahme der Substanz durch das FAE von ihrer Art abhängt (329). Ist es jedoch einmal zur Aufnahme einer Substanz gekommen, kann sich diese ungehindert innerhalb der Medulla verteilen.

Dass es sich bei den die Medulla formenden Zellen tatsächlich zum überwiegenden Teil um B-Lymphozyten handelt ist schon seit langem allgemein anerkannt, ebenso wie bei den die Follikelrinde bildenden Zellen. Auch unsere Untersuchungen bestätigten das massenhafte Auftreten von Lymphozyten in den Follikeln, sowohl in der HE-Färbung als auch in der in erster Linie als Positivkontrolle eingesetzten Färbung mit dem mAk 16-6. So war in der HE-Färbung gut zu erkennen, dass fast alle Zellen der Kortex und der Medulla die gleiche, für Lymphozyten typische Struktur aufwiesen. Sie waren mit durchschnittlich $5,0 \times 5,5 \mu\text{m}$ (Rinde) bzw. $6,5 \times 7,5 \mu\text{m}$ (Mark) eher klein, von sehr gleichmäßiger, runder Form und mit

einem großen, zentralen Zellkern ausgestattet. Auch die immunhistologische Untersuchung bestätigte diesen Befund einschließlich der Kern-Plasma-Relation von etwa 2:1 und dem ringförmig um den Kern gedrängten Zytoplasma, welches sich weder durch eine granuläre noch durch eine ausgesprochen hyaline Struktur hervorhob. Interessanterweise reagierten sowohl in der Medulla als auch im Kortex die meisten Zellen und damit auch der überwiegende Anteil der Lymphozyten negativ auf Färbung mit dem mAk 2G11. In der Literatur finden sich sogar Angaben darüber, dass die Lymphozyten des Marks gänzlich frei von MHC II-Molekülen sind (324), eine Aussage die in dieser Form jedoch nicht bestätigt werden konnte. Die kortikalen MHC II⁺ Lymphozyten wiederum schienen eine Lokalisation in unmittelbarer Nähe zum interfollikulären Bindegewebe zu bevorzugen. Eventuell hängt dies damit zusammen, dass weder Follikelmark noch -rinde Lymphgefäße aufweisen, die den Follikeln direkt benachbarten Lymphgefäße aber die einzige bekannte Möglichkeit der Lymphozyten darstellt, die Bursa wieder verlassen können (330). Die Tatsache, dass täglich etwa 5% der in der Bursa juveniler Hühner durch Zellteilung entstehenden B-Lymphozyten emigrieren (331) und dass diese Lymphozyten durch eine besonders hohe Expression von MHC II-Molekülen gekennzeichnet sind (332), ist dabei allgemein anerkannt. Da die geringe Expression eines Moleküls unter Umständen nicht ausreicht um eine positive Reaktion in der immunhistologischen Färbung hervorzurufen, besteht grundsätzlich die Möglichkeit dass die 2G11⁻ B-Zellen der Bursa zwar MHC II-Moleküle exprimieren, aber nur in einer sehr geringen, für einen immunhistologischen Nachweis nicht ausreichenden Quantität.

Myeloide Zellen waren in der Bursa im Allgemeinen nur in sehr geringer Anzahl vorhanden, wobei ihre bevorzugten Lokalisationen in der Bursawand, im interfollikulären Bindegewebe sowie im subepithelialen Bereich lagen. So traten beispielsweise die KUL01⁺ Zellen ausschließlich innerhalb dieser Strukturen auf. Die meisten von ihnen waren mit durchschnittlich 11,0 x 12,0 µm deutlich größer als die Lymphozyten und von rundlicher oder dreieckiger Form. Auch die anderen morphologischen Kriterien wie der exzentrische Kern, die Kern-Plasma-Relation von 1:1,5 bis 1:1 und das mit deutlichen Granula ausgestattete Zytoplasma erlauben die Beschreibung dieser Zellen als Makrophagen. Im Interfollikularraum und in der Bursawand war neben den Makrophagen noch eine zweite, weniger klar einzuordnende Zellpopulation vertreten. Die Zellen der Organwand wurden sogar zum überwiegenden Teil von dieser Population repräsentiert. Es handelte sich dabei um mit durchschnittlich ca. 4,5 x 14,5 µm sehr lange und schmale Zellen. Außerdem hoben sie sich von den Makrophagen durch die Ausbildung feiner Zytoplasmaausläufer an den Zellenden ab. In der Literatur wurden bereits ab dem Embryonaltag (ED) 9 geringe Zahlen an

KUL01⁺MHC II⁺ Zellen im interfollikulären Bindegewebe der Bursa beschrieben. Die Anwesenheit dieser Fresszellen scheint im Zusammenhang mit den in der Embryonalentwicklung ständig ablaufenden Reparations- und Clearance-Prozessen zwingend erforderlich zu sein (292). Auch in späteren Lebensphasen werden Makrophagen nahezu in allen Geweben und Organsystemen angetroffen, wo sie wichtige Funktionen im Zusammenhang mit der unspezifischen Immunabwehr übernehmen und als professionell Antigen-präsentierende Zellen als Vermittler zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunantwort fungieren. Welche Funktion die zweite Population der hier lokalisierten KUL01⁺ Zellen aufweist, ist jedoch unklar. Innerhalb des von diesem Antikörper erkannten Spektrums können sie aufgrund ihrer fragilen Zytoplasmaausziehungen noch am ehesten mit interdigitierenden DCs gleichgesetzt werden. Nicht in dieses Konzept passen jedoch die langgestreckte Zellform sowie die bevorzugte Besiedelung der Bursawand, wenn man wie beim Säuger davon ausgeht, dass es sich bei den IDCs um mit in lymphatischen Geweben befindlichen Lymphozyten reagierende dendritische Zellen handelt. Eventuell bestehen trotz des offensichtlich sehr hohen Konservierungsgrades zwischen dem MPS System der Vögel und dem der Säugetiere (294, 333) erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Funktionsweise und/oder der Lokalisation der dendritischen Zellen dieser beiden Tierklassen.

Der mAk 2G11 führte, ähnlich wie der mAk KUL01, zu einer positiven Reaktion von im subepithelialen Bereich lokalisierten Zellen (**Abb. 5-44**), wobei die Anzahl der positiv reagierenden Zellen deutlich höher war als beim mAk KUL01. Den morphologischen Kriterien nach zu urteilen handelte es sich bei diesen MHC II⁺ Zellen um Makrophagen. Auffallend war, dass sie regelmäßig in Kleinstaggregaten von zwei oder drei Zellen angetroffen wurden. Im Gegensatz zu den von Mast et al. generierten Daten war das interfollikuläre Bindegewebe jedoch frei von KUL01⁺ Makrophagen (292). Unter Umständen hängt dies mit dem Alter der untersuchten Tiere zusammen. Bei den von Mast et al. verwendeten Tiere handelte es sich um Embryonen zwischen dem Tag 9 und dem Tag 21 bzw. um zwischen drei und fünf Wochen alte Tiere, während die in dieser Arbeit eingesetzten Hühner mit etwa neun Wochen doppelt bis dreifach so alt waren. Bei Embryonen oder sehr jungen Tieren spielt das Vorhandensein interfollikulärer Makrophagen offensichtlich noch eine große Rolle um die im Zusammenhang mit der Bursaentwicklung auftretenden apoptotischen Zellen zu beseitigen. Ab einem gewissen Alter scheinen jedoch die subepithelialen Makrophagen im Vordergrund stehen, die damit optimal positioniert sind, um die vom FAE phagozytierten Antigene aufnehmen zu können. Weswegen die Anzahl der subepithelialen MHC II⁺ Zellen deutlich höher war als diejenige der KUL01⁺ Zellen, blieb

jedoch weiterhin unklar. Interessanterweise wurden auch in der Lederhaut -insbesondere im perivaskulären Bereich sowie im subepidermalen Bindegewebe- jeweils deutlich mehr MHC II⁺ als KUL01⁺ Zellen angetroffen. Entweder handelte es sich also bei den KUL01⁺ MHC II⁺ Zellen gar nicht um Makrophagen, sondern um eine andere Zellpopulation. Dieser Fall ist jedoch eher unwahrscheinlich, da die morphologischen Kriterien eindeutig auf Makrophagen schließen ließen. Die zweite, etwas wahrscheinlichere Erklärung wäre die, dass die Expression des vom mAk KUL01 erkannten Antigens im Laufe der Reifung der Makrophagen nachlässt, so dass dieser AK in erster Linie nur mit Makrophagenvorstufen wie Monozyten sowie eventuell mit noch nicht ausgereiften Makrophagen interagieren kann.

Die Population der relativ zahlreichen wandständigen MHC II⁺ Zellen war im Vergleich zu derjenigen des Parenchyms recht heterogen. Bei einer sehr kleinen Anzahl von ihnen schien es sich um Lymphozyten und Lymphozytenvorläufer zu handeln. Der weitaus größere Teil wurde jedoch von unregelmäßig geformten, meist länglichen Zellen repräsentiert, die sich durch die Ausbildung mehrerer feiner Zytoplasmaausläufer hervorhoben. Sie wiesen als einzige der wandständigen Zellarten eine gewisse Affinität zu den enthaltenen Blutgefäßen auf. Auf die Frage, warum diese dendritisch geformten Zellen ausgerechnet in der Bursawand so zahlreich vertreten waren, gibt es jedoch keine befriedigende Antwort.

Eine Tatsache die ebenfalls noch nicht ausreichend erklärt werden konnte, obschon seit etwa 12 Jahren bekannt, ist die überraschende Expression großer Mengen von MHC II-Molekülen durch die kleinen Blutgefäße an der Grenze zwischen Medulla und Kortex (324), ein Phänomen das auch in den untersuchten Proben regelmäßig auffiel. Es schien aber nicht nur auf die Bursa beschränkt zu sein, sondern trat auch in anderen stark exponierten Organen wie etwa der Haut auf, in der die Endothelzellen der Blutgefäße ebenfalls sehr spezifisch auf die Färbung mit dem mAk 2G11 reagierten. Bekanntermaßen können MHC II-Moleküle nur aus intrazellulären Vesikeln stammende Antigenpeptide präsentieren, also beispielsweise Peptide von durch Phagozytose aufgenommenen Pathogenen. Die Möglichkeit der Partikelaufnahme durch Gefäßendothelien erscheint jedoch sehr abwegig. Vermutlich steht die Expression von MHC II-Molekülen in diesem Fall daher in keinerlei Verbindung zur Antigenpräsentation, sondern dient einem völlig anderen, noch unbekanntem Zweck.

Analog zur Färbung mit den mAks 16-6 und mAk 3-6 wurden auch vereinzelte intraepitheliale MHC II⁺ Zellen angetroffen. Es handelte sich dabei jeweils um eher kleine, rundliche Zellen mit mittelgroßen Kernen und homogenem Zytoplasma, so dass eine eindeutige morphologische Zuordnung entweder zum MPS oder zur lymphoiden Linie nicht möglich war. Größe und Form sprachen jedoch eher für Lymphozyten.

Die intrafollikuläre MHC II⁺ Population war ebenfalls sehr klein. Sie verteilte sich auf die Peripherie der Rinde und den medullären Bereich. Letztere Lokalisation wurde jedoch nur unregelmäßig und äußerst selten gefunden, so dass sie wahrscheinlich vernachlässigt werden kann. Bei den positiven Zellen in der Rinde handelte es sich zum überwiegenden Teil um Makrophagen, während MHC II⁺ Lymphozyten sehr selten waren (s. o.).

Auch der mAk 3-6 erkannte in der Peripherie des Kortex relativ viele Zellen (**Abb. 5-45**), wobei ein kleiner Prozentsatz davon eine lymphozytäre Morphologie aufwies. Bei der zweiten in diesem Bereich mit dem mAK 3-6 reagierenden Zellpopulation schien es sich wider Erwarten jedoch nicht um Makrophagen zu handeln, da das Zytoplasma dieser unregelmäßig geformten Zellen mehrere schmale Ausläufer bildete. Die Zellen traten oft gehäuft und in regelrechten Konglomeraten auf, so dass eine exakte Beschreibung ihrer Morphologie nur eingeschränkt möglich war. Die mögliche Anwesenheit dendritischer Zellen in der Kortex kann als ein weiterer Hinweis auf die Funktion der Bursa nicht nur als primäres, sondern auch als sekundäres lymphatisches Organ gewertet werden. In diesem Zusammenhang sollte jedoch stets bedacht werden, dass es sich bei der Bursa um ein „temporäres“ Organ handelt, welches sich spätestens mit Einsetzen der Geschlechtsreife zurückbildet. Die Bursa kann deshalb nicht als funktionelles Äquivalent zum Lymphknoten des Säugers betrachtet werden.

Parallelen bestanden im Übrigen nicht nur zwischen den mAks 3-6 und 2G11, sondern auch zwischen den mAks 3-6 und CVI-ChNL-68.1. In beiden Fällen reagierten relativ viele im subepithelialen Bereich lokalisierte Zellen positiv, die sich morphologisch jedoch relativ schlecht einordnen ließen. Bezüglich Form und Größe ähnelten sie zwar Lymphozyten, wiesen aber zum Teil nur kleine bis mäßig große, exzentrisch gelegene Zellkerne und oft ein granuläres Zytoplasma auf. Abgesehen davon kann die Interaktion von Lymphozyten mit diesen mAks aufgrund der bisherigen Ergebnisse ausgeschlossen werden. Eine exakte morphologische Charakterisierung der Zellen war aufgrund ihrer recht starken Tendenz zur Akkumulation ohnehin kaum möglich, so dass alle diesbezüglichen Aussagen einen spekulativen Charakter aufweisen. In der Literatur wurden die subepithelialen CVI-ChNL-68.1⁺ Zellen pauschal als mononukleäre Phagozyten beschrieben, gleichfalls die positiven Zellen in der Peripherie der Rinde und im Follikelmark (324). Auch in der vorliegenden Arbeit konnten in den beiden letztgenannten Lokalisationen positive Zellen detektiert werden (**Abb.5-48**). Es handelte sich dabei um mittelgroße, meist ovale Zellen mit ebenfalls mittelgroßem, zentralem Kern und feingranulärem Zytoplasma. In diesem Fall von mononukleären Phagozyten zu sprechen scheint daher durchaus gerechtfertigt.

Die vereinzelt intraepithelialen CVI-ChNL-68.1⁺ Zellen wiederum wiesen mit ihrer polygonalen Form und dem granulären Zytoplasma schließlich alle wesentlichen Kriterien reifer Makrophagen auf. Sie wurden ebenfalls bereits schon von Jeurissen et al. beschrieben (294). Ihre Lokalisation erscheint ideal, um eingedrungene exogene Antigene schnellstmöglich detektieren und abwehren zu können.

Ein weiterer von den insgesamt nur mäßig zahlreichen CVI-ChNL-68.1⁺ Zellen besiedelter Bereich war das interfollikuläre Bindegewebe. Vom subjektiven Eindruck her entsprach die Anzahl der positiven Zellen hier in etwa derjenigen der interfollikulären KUL01⁺ Zellen, war interessanterweise jedoch deutlich geringer als die Anzahl der CVI-ChNL-74.2⁺ Zellen in diesem Bereich, obwohl dieser AK nur eine Subpopulation reifer Gewebemakrophagen erkennen soll. Eventuell exprimieren die Makrophagen die für die Erkennung durch die mAk KUL01 und CVI-ChNL-68.1 notwendigen Antigene ab einem gewissen Reifestadium nicht mehr, wie es weiter oben -zumindest was den mAk KUL01 betrifft- bereits postuliert wurde. Analog zu diesem AK konnte auch beim mAk CVI-ChNL-68.1 zwischen zwei Subpopulationen differenziert werden, einer zahlenmäßig weit überlegenen Makrophagenpopulation sowie einer dendroiden, morphologisch nicht einwandfrei zuzuordnenden zweiten Population. Trotz ihrer langen, schmalen Form handelte es sich bei dieser Population vermutlich um interdigitierende DCs, da die Zellen fragile Zytoplasmaausziehungen aufwiesen und andere Zellen innerhalb des vom mAk CVI-ChNL-68.1 erkannten Spektrums nicht in Frage kommen. Auch in diesem Fall würde sich eine dreidimensionale Ansicht der Zellen mit Hilfe eines Konfokalmikroskops lohnen, um eine bessere Aussage über die Zellform und damit eventuell über die Zellart treffen zu können. Auch Doppelfärbungen mit dem mAk CVI-ChNL-68.1 einerseits und einem für B- bzw. T-Lymphozyten spezifischen Marker wären gegebenenfalls eine gute Option um festzustellen, ob die funktionweise dendritischer Zellen von Vögeln und Säugern vergleichbar ist.

Die überraschend große Anzahl CVI-ChNL-74.2⁺ Zellen wurde bereits kurz angedeutet. Sie befanden sich in erster Linie im interfollikulären Bindegewebe, in der Organwand und im subepithelialen Bereich. Erstaunlich war nicht nur ihre relativ große Anzahl, sondern auch -wenn man das eingeschränkte Spektrum des mAk CVI-ChNL-74.2 bedenkt- ihre morphologische Heterogenität. Wie im Kapitel 6.2 ausführlich erläutert, wurde dieses Phänomen auch in der Haut regelmäßig beobachtet. Ein Teil der Zellen wies dabei alle morphologischen Kriterien reifer Makrophagen auf, die weitaus überwiegende Anzahl war jedoch durch eine schmale, langgestreckte Form und extrem feine Zytoplasmafortsätze

gekennzeichnet. Lediglich im subepithelialen Bereich waren fast ausschließlich CVI-ChNL-74.2⁺ MHC II⁺ Makrophagen vorhanden. Sie scheinen in dieser Lokalisation äußerst wichtig zu sein, wahrscheinlich um vom FAE absorbierte Antigene möglichst schnell verarbeiten und präsentieren zu können. Bezüglich der dendroid geformten Subpopulation drängt sich ähnlich wie in der Haut der Verdacht auf, dass es sich um interstitielle dendritische Zellen handeln könnte. Eine dreidimensionale Rekonstruktion der betroffenen Zellen sowie insbesondere die exakte Charakterisierung des vom mAk CVI-ChNL-74.2 erkannten Antigens scheinen unumgänglich, um bessere Antworten auf diese Fragen geben zu können. Die Lokalisation CVI-ChNL-74.2⁺ Zellen im interfollikulären Bindegewebe und im subepithelialen Bereich wurde im Übrigen bereits 1994 von Jeurissen et al. beschrieben (334). In besagtem Artikel ist jedoch auch von vereinzelt positiven Zellen in der Medulla und im Kortex die Rede, eine Behauptung die durch die vorliegende Arbeit nicht bestätigt wurde.

Mit dem mAk CVI-ChNL-74.3 gelang es schließlich, eine relativ große Anzahl gleichmäßig im Follikelmark verteilter Zellen anzufärben (**Abb. 5-51**). Es handelte sich dabei meist um kleine, rundliche Zellen mit sehr großem Kern und homogenem Zytoplasma. In der Literatur war in dieser Lokalisation ebenfalls von relativ kleinen, jedoch dendritisch geformten CVI-ChNL-74.3⁺ Zellen die Rede (324), die damit zumindest morphologisch den FDCs der Säugetiere sehr nahe kamen. Im gleichen Artikel wurde auch beschrieben, dass 72 Stunden nach intravenöser Applikation von AG dieses in Form von Immunkomplexen auf CVI-ChNL-74.3⁺ Zellen in germinalen Zentren der Milz angetroffen werden konnte, was ebenfalls auf eine starke Analogie zwischen den aviären FDCs und den FDCs der Säuger hinweist. Auch existieren Studien, in denen die Lokalisation von im Zuge einer AK-Reaktion neu gebildeten Immunkomplexen untersucht wurde. Sowohl die Lokalisation der gebildeten AK als auch die des assoziierten AG stimmten hier zwar nicht exakt mit der Lage der CVI-ChNL-74.3⁺ Zellen überein (291), da aber dennoch eine starke Korrelation mit den entsprechenden Zellkörpern vorlag bedeutet dies lediglich, dass das vom mAk CVI-ChNL-74.3 erkannte AG nicht mit den Immunkomplexen assoziiert ist. Letztendlich kann das Vorkommen der CVI-ChNL-74.3⁺ Zellen in der Medulla der Bursafollikel damit als ein weiterer Hinweis auf die Funktion der Bursa nicht nur als primäres sondern auch als sekundäres lymphatisches Organ gewertet werden.

6.5 Struktur der Hühnerlunge

Ähnlich wie die Haut spielt auch das Lungengewebe aufgrund seiner exponierten Lage, seiner Größe und nicht zuletzt aufgrund seiner (zellulären) Struktur eine nicht zu unterschätzende

Rolle als Barriere gegenüber potentiellen Pathogenen aus der Umwelt. Dabei wird bei den pulmonalen Abwehrmechanismen zwischen den unspezifischen und den spezifischen Abwehrmechanismen unterschieden.

Das in der Trachea, den Primärbronchen und den Anfangsabschnitten der Sekundärbronchen auftretende mehrreihige Flimmerepithel stellt dabei vielleicht den auffälligsten unspezifischen Abwehrmechanismus dar. Durch retrograde Bewegungen der Zilien, verbunden mit dem zähflüssigen Sekret seromuköser Drüsen, wird im Normalfall der Großteil des in der Luft befindlichen Staubs einschließlich der darin eventuell vorhandenen Pathogene am Eindringen in den Organismus gehindert. In der Literatur wird dieser Vorgang häufig als mukoziliare Clearance bezeichnet (324). Zusätzlich kommt es durch die zahlreichen Verzweigungen des Bronchialbaums zur so genannten aerodynamischen Filtration, d.h. zum Abfangen größerer Partikel in den oberen Luftwegen (335). Auf die unspezifischen Abwehrmechanismen auf zellulärer Ebene soll erst im nächsten Kapitel genauer eingegangen werden, während die spezifischen zellulären Abwehrmechanismen, die generell an lymphatische Immunzellen gebunden sind und somit strenggenommen nicht zum Thema dieser Arbeit gehören, nur am Rande erwähnt werden sollen.

Besonders erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang aber das einschichtige Epithel in der Wandung der Atrien in welchem, wie bereits beschrieben, oft intrazelluläre Einschlüsse beobachtet werden konnten. Eventuell ist es auf diese Weise möglich Antigene, denen es gelungen ist die vorgeschalteten Abwehrmechanismen zu überwinden, abzufangen und zu phagozytieren, um die entsprechenden Antigene an andere Immunzellen weitergeben zu können. Die Atriumepithelzellen fungieren deshalb unter Umständen als wichtige Vermittler zwischen der Umwelt und dem Immunsystem. Die zahlreichen beobachteten Leukozytenansammlungen in der Parabronchuswand, insbesondere im Bereich der Atrienwände, unterstützen diese These. Auch Zengerling beschrieb Leukozytenaggregate in der gleichen Lokalisation, wobei es sich hier um zwei etwa gleichgroße Populationen von T-Helfer- bzw. zytotoxischen T-Zellen gehandelt haben soll (297).

6.6 Myeloide Zellen in der Hühnerlunge

Vielleicht die wichtigste Struktur hinsichtlich der spezifischen Abwehr von Pathogenen wird in der Lunge vom BALT repräsentiert. In diesem Zusammenhang ist schon seit längerem bekannt, dass die Struktur des BALT sowohl von der Stärke der Antigenexposition als auch vom Alter der Tiere abhängt. So entstehen am Anfang der ontogenetischen Entwicklung regelrechte Ansammlungen von T-Zellen, innerhalb derer nur wenige B-Lymphozyten

anzutreffen sind. Später beginnen die B- und T-Zellen jeweils unterschiedliche Bereiche zu besiedeln, wobei die Bildung von Follikeln auf die T-Zellbereiche beschränkt bleibt (336, 337). Im Alter von etwa 13 Wochen, also einer der in dieser Arbeit verwendeten vergleichbaren Altersgruppe, tritt schließlich im Vergleich zu den ursprünglichen Verhältnissen eine Umkehr der T- und B-Zellareale ein. Die Lymphfollikel sind nunmehr reine, scharf vom perifollikulären Bereich abgegrenzte B-Zellareale. Sie sollen dabei vor allem von den $CD4^+$ T-Helfer-Zellen umgeben sein. Auch $CD8^+$ T-Zellen kommen vor, wenn auch in einer wesentlich geringeren Anzahl, sowie relativ viele B-Zellen. Einzelne der $CD8^+$ T-Zellen sind im FAE als intraepitheliale Lymphozyten angetroffen worden (297). Aufgrund der altersabhängigen Entwicklung des BALT kann nicht ausgeschlossen werden, dass es je nach Altersstufe unterschiedliche Funktionen übernimmt. Die momentan vorherrschende Meinung besagt zwar, dass dieses lymphatische Gewebe primär zur Antigenaufnahme dient, potentielle andere Funktionen können jedoch nicht mit völliger Sicherheit ausgeschlossen werden.

Was die Färbung mit dem mAk 16-6 anbelangt, so handelte es sich bei den innerhalb des BALT lokalisierten Zellen erwartungsgemäß zum überwiegenden Teil um Lymphozyten. Interessanterweise waren diese jedoch MHC II⁺, ein Phänomen das bereits bei den B-Lymphozyten der Bursa aufgefallen war. Auch Jeurissen et al. erwähnen in ihrer Übersichtsarbeit über die lymphatischen Gewebe des Huhns nicht explizit MHC II⁺ Lymphozyten im BALT (324). Natürlich besteht aber auch in diesem Fall die Möglichkeit, dass die Menge der zum untersuchten Zeitpunkt exprimierten MHC II-Moleküle für ein positives Färbeergebnis einfach nicht ausreichend ist. Neben den zahlreichen, das BALT zum Großteil bildenden $CD45^+$ Lymphozyten konnten auch intraepithelial vereinzelt $CD45^+$ Leukozyten nachgewiesen werden, welche alle morphologischen Kriterien eines Lymphozyten erfüllten. Vom Säuger ist bekannt, dass es sich bei diesen lokal auftretenden intraepithelialen Lymphozyten in den meisten Fällen um $CD8^+$ T-Zellen handelt, die aufgrund ihrer starken zytolytischen und immunregulatorischen Potenz einen wichtigen Beitrag zur Integrität des Epithels leisten (338).

Eine geringe Anzahl perifollikulär sowie in sehr geringer Dichte diffus in den T-Zellbereichen verteilter KUL01⁺ Zellen konnte ebenfalls bestätigt werden. In diesem Fall handelte es sich eindeutig um Makrophagen. Neben dem für die Erkennung durch den mAk KUL01 relevanten Antigen exprimierten diese Zellen offensichtlich auch MHC II⁺ Moleküle auf ihrer Oberfläche, da eine ähnlich geringe Anzahl morphologisch identischer MHC II⁺ Zellen in analoger Verteilung angetroffen wurde. Für die initiale Aufnahme von durch das FAE

phagozytierten Antigenen sind wahrscheinlich aber eher die CVI-ChNL-68.1⁺ Makrophagen von Bedeutung, da diese Zellen zum Großteil direkt subepithelial lokalisiert waren. Jeurissen spricht in diesem Zusammenhang sogar von einer „fortlaufenden Schicht“ (294). Dass dagegen CVI-ChNL-74.2⁺ Makrophagen nicht im BALT sondern lediglich in der Parabronchuswand sowie im Lungenparenchym angetroffen wurden, scheint ein weiterer Hinweis darauf zu sein, dass die verwendeten für das MPS spezifischen myeloiden Antikörper durchaus in der Lage sind, jeweils unterschiedliche Subpopulationen von Makrophagen zu erkennen. Diese unterscheiden sich in erster Linie bezüglich der von ihnen exprimierten Moleküle und damit vermutlich auch bezüglich ihres Reifestatus und/oder ihrer Funktion. So wurden intrafollikuläre Zellen nur von den mAKs 3-6, CVI-ChNL-68.1 und CVI-ChNL-74.3 erkannt. Dabei war wiederum die Anzahl der intrafollikulären 3-6⁺ Zellen ungewöhnlich groß. Ihre morphologische Klassifizierung war aufgrund der recht hohen Zelldichte und der zweidimensionalen Darstellung zwar relativ schwierig, eventuell handelt es sich jedoch um dendritische Zellen. Bei den intrafollikulären CVI-ChNL-68.1⁺ Zellen konnte zwischen zwei Subpopulationen differenziert werden. So wies ein sehr geringer Prozentsatz die typische Makrophagenmorphologie auf, während der überwiegende Teil zumindest äußerlich den Zellen entsprach, die der für follikuläre DCs spezifische mAK CVI-ChNL-74.3 in den Follikeln des BALT erkannte. Es handelte sich dabei um relativ kleine, rundliche Zellen mit sehr großem Kern und homogenem Zytoplasma. Auch in der Medulla der Bursafollikel erkannte der mAK CVI-ChNL-74.3 im Übrigen eine morphologisch identische Zellpopulation (siehe dort). Erwähnenswert im Zusammenhang mit diesem mAK ist aber insbesondere die bereits erwähnte, starke, spezifische Reaktion der Atriumepithelzellen. Sie sollte als Indiz dafür gewertet werden, dass das für diesen Antikörper spezifische Antigen nicht auf den Immunkomplexen der FDCs lokalisiert sein kann, sondern dass es sich um ein davon unabhängiges, offensichtlich auch von anderen Zellarten als den FDCs synthetisiertes Protein handeln muss. Da im Gegensatz zu Jeurissens Daten die in unseren Proben nachgewiesenen CVI-ChNL-74.3⁺ Zellen jedoch in keinem der Fälle eine eindeutig dendritische Form aufwiesen, wäre auch hier eine Verifizierung der Zellmorphologie durch eine dreidimensionale Darstellung angebracht, um genauere Hinweise zu erhalten.

Im Parenchym fielen insbesondere die interatrialen Septen durch ihre relativ hohe Anzahl an Lymphozyten auf, während die Makrophagen in diesem Bereich nur einen geringen Prozentsatz der Gesamtpopulation stellten. Regelrechte lymphozytäre Zellansammlungen fanden sich auch im interparabronchialen Bindegewebe, insbesondere in den Zwickeln in unmittelbarer Nähe größerer Blutgefäße. Bestätigt wurde diese Feststellung durch Zengerling,

die in diesem Bereich ebenfalls größere Anhäufungen CD45⁺ Zellen vorfand, die sich gleichmäßig aus B- und T-Lymphozyten zusammensetzten, wobei die T-Zell-Population wiederum zu etwa gleichen Teilen aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bestand. Eine Unterteilung in spezielle B- und T-Zellareale konnte dabei nicht festgestellt werden (297).

Bei einigen wenigen der in den Zwickeln lokalisierten Zellen handelte es sich auch um KUL01⁺MHC II⁻ Makrophagen. Die Lokalisation all dieser Zellen im Bereich größerer Blutgefäße, die unorganisierte Verteilung der T- und B-Lymphozyten und nicht zuletzt die fehlende Expression von MHC II-Molekülen durch die Makrophagen legen dabei die Vermutung nahe, dass es sich um frisch aus dem Blutgefäßsystem rekrutierte Zellen handelt. Die Frage allerdings, ob diese Rekrutierung mit der Aktivierung anderer Immunzellen durch ein spezifisches Antigen und/oder der Freisetzung bestimmter Chemokine zusammenhängt, kann zum momentanen Zeitpunkt nicht beantwortet werden.

Eine weitere Population, die in den interparabronchialen Septen und den Zwickeln regelmäßig gesehen wurde, waren die 3-6⁺ Zellen, die morphologisch jedoch weder Lymphozyten noch den Zellen des MPS ähnelten. Im Gegensatz zu den 3-6⁺ Zellen der Dermis und der Bursafollikel konnten im Lungenparenchym jedoch keine verschiedenen Subpopulationen unterschieden werden. Es handelte sich stets um mittelgroße, meist länglich-ovale Zellen mit relativ kleinem Kern und fortsatzlosem, homogenem Zytoplasma. Eventuell sind auch diese Zellen in relativ unreifem Zustand aus dem Blutgefäßsystem rekrutiert worden, so dass eine Änderung der Zellmorphologie und/oder der Expression ihrer (Oberflächen-)Antigene durchaus noch möglich wäre.

Die CVI-ChNL-68.1⁺ Zellen in den bindegewebigen Zwickeln des Parenchyms wiederum formierten sich zu regelrechten Aggregaten (**Abb. 5-64**), während die atrialen Septen negativ waren. Ihre Morphologie innerhalb der Aggregate war aufgrund der recht hohen Zelldichte nur schwer zu beurteilen, erinnerte aber von den bisher beschriebenen Zellen noch am ehesten an reife Makrophagen.

Die CVI-ChNL-74.2⁺ Zellen in den interatrialen Septen (**Abb. 5-67**) und in den Zwickeln des interparabronchialen Bindegewebes dagegen traten nur in sehr geringer Anzahl auf und hatten morphologisch nur wenig mit Makrophagen gemein. Sie ähnelten bis auf die extrem unregelmäßige Form eher den 3-6⁺ Zellen in den entsprechenden Lokalisationen. Dies ist insbesondere deswegen erstaunlich, da der mAk CVI-ChNL-74.2 wie bereits mehrfach erwähnt nur reife Gewebemakrophagen erkennen soll.

Auch die Tatsache, dass CVI-ChNL-74.3⁺ Zellen nicht nur im BALT sondern auch, wenn auch nur vereinzelt, in den interparabronchialen Septen angesiedelt waren (**Abb. 5-70**),

konnte nur schwer eingeordnet werden, da die betroffenen Zellen bis auf die Form in keinsten Weise den in den Follikeln angesiedelten FDCs ähnelten. Entweder handelt es sich bei den aviären FDCs also gar nicht um eine homogene sondern um eine aus verschiedenen Subpopulationen zusammengesetzte Population und/oder das vom mAk CVI-ChNL-74.3 erkannte Antigen wird nicht nur spezifisch von FDCs exprimiert, sondern auch von bestimmten anderen Zellarten. Letztere These wird insbesondere von der äußerst spezifischen Anfärbung der Atriumpithelzellen durch diesen Antikörper gestützt.

Innerhalb der Parabronchuswand waren vor allem die tieferen Abschnitte stark von myeloiden Zellen besiedelt. So war das Gros der KUL01⁺MHC II⁺ Makrophagen im Bereich der Infundibula und vor allem der Luftkapillaren anzutreffen. Ebenso verhielt es sich mit den CVI-ChNL-68.1⁺ Zellen (**Abb. 5-63**), wobei diese nur zum Teil von Makrophagen repräsentiert wurden. Die zweite der ungefähr gleich großen Subpopulationen ähnelte eher den follikulären CVI-ChNL-74.3⁺ Zellen im Follikelmark der Bursa und den Follikeln im BALT. Es handelte sich hier um eher kleine, rundliche Zellen mit extrem großem Kern. Oft konnten die beiden Populationen jedoch nicht eindeutig differenziert werden. Aufgrund der sonstigen Färbeergebnisse ist aber anzunehmen, dass beide dem MPS zuzuordnen sind und die Ähnlichkeit zu den CVI-ChNL-74.3⁺ FDCs rein morphologischer Natur ist.

In etwas geringerer Anzahl als die CVI-ChNL-68.1⁺ Zellen konnten in den tieferen Abschnitten der parabronchialen Wand auch CVI-ChNL-74.2⁺ Makrophagen angetroffen werden (**Abb. 5-66**). Ähnlich wie die in der Lunge insgesamt nicht besonders zahlreich vertretenen KUL01⁺MHC II⁺ Makrophagen lagen sie oft in diffuser Verteilung vor, so dass sich die beiden Populationen wahrscheinlich zumindest teilweise überschneiden. Die Anwesenheit relativ großer Mengen an Makrophagen in diesen tiefen Abschnitten der Parabronchuswand ist dabei keinesfalls verwunderlich wenn man bedenkt, dass zahlreiche potentielle Pathogene schon allein aufgrund ihrer geringen Größe durch die ersten Barrieren der Abwehr -mukoziliare Clearance und aerodynamischen Filtration- nicht am Eindringen in die unteren Luftwege gehindert werden. So wurden größere Partikel (3,7-7,0 µm) zwar bereits in der Nasenhöhle oder der cranialen Trachea abgefangen, während mittelgroße (1,1 µm) und kleine (0,091 µm) Teilchen bis in die Lunge und die abdominalen Luftsäcke gelangen konnten (335).

Auch die 3-6⁺ Zellen schienen die tieferen Abschnitte der Parabronchuswand zu bevorzugen. Morphologisch entsprachen diese Zellen denjenigen in den interparabronchialen Septen und Zwickeln, also einer vermutlich noch unreifen Population. Es ist gut möglich, dass diese Zellen über das Blutgefäßsystem ins Lungenparenchym transportiert werden, um erst im

BALT zu reifen und ihre eigentliche Funktion als professionell Antigen-präsentierende Zellen auszuüben.

7 ZUSAMMENFASSUNG

In situ characterization of avian myeloid cells in the skin, bursa and lung of chicken

Über die Lokalisation, Morphologie und Kompartimentierung aviärer myeloider Zellen ist zum derzeitigen Stand der Forschung nur sehr wenig bekannt, und das obwohl dieses Wissen unverzichtbar für das Verständnis der Funktion dieser Zellen und damit der grundlegenden Mechanismen der Immunabwehr beim Vogel ist. In der vorliegenden Arbeit wurden daher drei stark exponierte Organsysteme, nämlich die äußere Haut, die Bursa und die Lunge immunhistologisch mit verschiedenen myeloiden Markern untersucht und die positiven Zellen hinsichtlich ihrer Morphologie und ihrer Verteilung im Gewebe ausgewertet. Bei den untersuchten Hühnern handelte es sich um Weiße Leghörner im Alter von neun bis zwölf Wochen. An Antikörpern wurden der Panleukozytenmarker 16-6, die gegen Monozyten, Makrophagen und interdigitierende DCs gerichteten mAks KUL01 und CVI-ChNL-68.1, die für MHC II-Moleküle spezifischen mAks 2G11 und LD42, der mit reifen Gewebemakrophagen reagierende mAk CVI-ChNL-74.2, der gegen follikuläre DCs gerichtete mAk CVI-ChNL-74.3 sowie der mAk 3-6, ein Antikörper mit unbekannter Spezifität, eingesetzt. Bei den Hautproben kamen zusätzlich die für γ/δ T-Zellen beziehungsweise α/β T-Zellen spezifischen mAks anti-TCR-1 und anti-TCR-2 zum Einsatz.

Im Falle der Haut wurden verschiedene Regionen untersucht und miteinander verglichen. Zwischen den verschiedenen befiederten Bereichen -also der Brust-, der Hals- und der Flügelhaut- konnten dabei keine Unterschiede festgestellt werden. Zwischen der unbefiederten Haut des Tarsometatarsus und den befiederten Arealen sowie dem Kehllappen fielen dagegen zum Teil große strukturelle Differenzen auf. Allen Regionen gemeinsam war die insgesamt sehr hohe Anzahl an Leukozyten. Diese setzten sich fast ausschließlich aus Zellen myeloider Herkunft zusammen, während Lymphozyten fast vollständig fehlten. Insbesondere γ/δ T-Zellen wurden nicht angetroffen. Was die DCs betrifft so konnten in Analogie zum Säugetier mindestens zwei verschiedene Subpopulationen unterschieden werden: eine LC-ähnliche in unmittelbarem Kontakt zum Stratum basale sowie eine dermale, die sich mehr oder weniger gleichmäßig über alle Schichten der Lederhaut verteilte.

Die Anzahl der myeloiden Zellen in der Bursa war vergleichsweise gering. So wurden im Follikelmark nur vereinzelte Zellen des MPS gefunden, lediglich die Anzahl der follikulären DCs war hier etwas höher. In der Rinde wiederum kamen nur vereinzelte MHC II⁺

Makrophagen und einige wenige CVI-ChNL-68.1⁺ Zellen vor. In diesem Bereich überwogen die 3-6⁺ Zellen. Der Großteil dieser Zellen fiel durch seine zahlreichen fragilen Fortsätze auf. Sie lagen zwar oft in regelrechten Aggregaten vor und waren deshalb morphologisch schwierig zu beurteilen, offensichtlich handelte es sich aber um DCs. Im interfollikulären Bereich überwogen wiederum die CVI-ChNL-74.2⁺ Zellen, dicht gefolgt von den KUL01⁺ Makrophagen. Im Epithel der Primärfalten wurden lediglich mit den mAKs 2G11, 3-6 und CVI-ChNL-68.1 vereinzelt Zellen gefunden, während subepithelial auch KUL01⁺ und CVI-ChNL-74.2⁺ Zellen auftraten. Die Gesamtzahl positiver Zellen war hier wesentlich höher und wurde in erster Linie von 3-6⁺, morphologisch etwas schwierig einzuordnenden Zellen und CVI-ChNL-68.1⁺ Makrophagen repräsentiert.

Das Lungenparenchym schließlich wies im Vergleich zur Haut ebenfalls nur eine relativ geringe Zahl myeloider Zellen auf, insbesondere was die Parabronchuswand und das interparabronchiale Bindegewebe betraf. Im BALT dagegen war die Anzahl positiver Zellen vergleichsweise hoch. So wurden hier vor allem sehr viele meist intrafollikulär lokalisierte 3-6⁺ Zellen angetroffen. Es ist anzunehmen, dass es sich bei dieser Population um (interdigitierende) DCs handelt. Weiterhin enthielt das BALT regelmäßig FDCs sowie CVI-ChNL-68.1⁺ Makrophagen, die bevorzugt die ans FAE angrenzenden Bereiche besiedelten. Zum Teil wurden CVI-ChNL-68.1⁺ Zellen auch intrafollikulär angetroffen. Diese Population erinnerte aber zumindest morphologisch eher an die CVI-ChNL-74.3⁺ FDCs als an Zellen des MPS. KUL01⁺ MHC II⁺ Makrophagen traten im BALT ebenfalls auf, jedoch nur in sehr geringer Anzahl und nie innerhalb der Follikel. Weitere Lokalisationen die regelmäßig von KUL01⁺ Makrophagen bevölkert wurden waren die Zwickel des Lungenparenchyms sowie die tieferen Abschnitte der Parabronchuswand, wobei nur die Zellen in letzterer Lokalisation auch MHC II-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimierten. Hier fanden sich auch stets CVI-ChNL-74.2⁺ Makrophagen. Auch in den Zwickeln und den interatrialen Septen fanden sich häufig CVI-ChNL-74.2⁺ Zellen, die jedoch kaum als Makrophagen angesprochen werden konnten. Die CVI-ChNL-68.1⁺ Zellen bevorzugten innerhalb des Parenchyms ebenfalls die bindegewebigen Zwickel und die tieferen Abschnitte der Parabronchuswand. Zum Teil waren sie morphologisch eindeutig als Makrophagen zu identifizieren, zum Teil handelte es sich um noch nicht ganz ausgereifte Übergangsformen. CVI-ChNL-74.3⁺ Zellen schließlich wurden erstaunlicherweise nicht nur im BALT sondern auch im Lungenparenchym diffus verteilt oder im Bereich der interparabronchialen Septen angetroffen. Innerhalb der Parabronchuswand führte dieser AK stets zu einer äußerst spezifischen Reaktion der Atriumepithelzellen.

8 SUMMARY

In *situ* characterization of avian myeloid cells in the skin, bursa and lung of chicken

Currently, little is known about the localization, morphology and compartmentalization of avian myeloid cells. However, this knowledge is essential for the understanding of the function of these cells and of the basic mechanisms of the immune defense in birds. Thus, in this work three organ systems heavily exposed to environmental antigens –the outer skin, the bursa and the lungs- were investigated immunohistological with different myeloid markers. The positive cells were analyzed in reference to their morphology and their distribution in the tissues. White leghorn birds in the age of nine to twelve weeks were used in this study. As antibodies served the mab 16-6 for all leukocytes, the mabs KUL01 and CVI-ChNL-68.1 for monocytes, macrophages and interdigitating DCs, the mabs 2G11 and LD42 for MHC II-molecules, the mab CVI-ChNL-74.2 for mature macrophages, the mab CVI-ChNL-74.3 for follicular DCs and the mab 3-6, an antibody with unknown specificity. The skin was additionally investigated with the mabs anti-TCR-1 and anti-TCR-2, respectively, which are directed against γ/δ T-cells and α/β T-cells.

Therefore, different skin regions were compared. No differences were found between the feathered areas of the skin of the chest, of the throat and of the wings. In contrast, great structural differences were seen between the unfeathered skin of the *tarsometatarsus* and the feathered areas as well as the wattle skin. All regions had in common a very high number of leucocytes. These were mainly composed of cells of myeloid origin, whereas lymphocytes were nearly absent. In particular, γ/δ T cells were not encountered. With regard to DC-like cells, at least two different subpopulations could be distinguished in analogy to the mammals: one LC-like subpopulation in direct contact to the *stratum basale* as well as a dermal subpopulation distributed quite evenly over all layers of the dermis.

The number of myeloid cells in the bursa was comparatively small. In the *medulla* of the follicles only sporadically cells of the MPS were found. Only the number of follicular DCs was a little bit higher. In the cortex only singular MHC II⁺ macrophages and few CVI-ChNL-68.1⁺ cells were found. In this zone the 3-6⁺ cells preponderated. The larger part of these cells attracted attention because of their numerous fragile appendages. Frequently, these cells formed aggregates, thus preventing further morphological characterization. In the interfollicular regions, CVI-ChNL-74.2⁺ cells preponderated, closely followed by the KUL01⁺

macrophages. In the epithelium of the primary folds only with the mabs 2G11, 3-6 and CVI-ChNL-68.1 singular cells were found, whereas KUL01⁺ and CVI-ChNL-74.2⁺ cells appeared in the subepithelial areas. Altogether, the number of positively stained cells was here considerably higher. They were primarily represented by 3-6⁺ cells, which were a little difficult to classify morphologically, and by CVI-ChNL-68.1⁺ macrophages.

The lung parenchyma featured smaller numbers of myeloid cells compared with the skin. In particular, only few cells populated the parabronchial wall and the interparabronchial connective tissue. In contrast, the number of positive cells in the BALT was comparatively high. Most notably, many intrafollicularly localized 3-6⁺ cells were encountered. Supposably, this population consists of (interdigitating) DCs. Furthermore, the BALT contained regularly FDCs as well as CVI-ChNL-68.1⁺ macrophages. The latter populated preferentially the areas adjacent to the FAE. In part CVI-ChNL-68.1⁺ cells were encountered intrafollicular, too. However, this population resembled rather the CVI-ChNL-74.3⁺ FDCs than cells of the MPS, at least morphologically. KUL01⁺ MHC II⁺ macrophages appeared in the BALT, also, but only in small numbers and never inside the follicles. The gussets of the lung parenchyma as well as the deeper layers of the parabronchial wall were regularly populated by KUL01⁺ macrophages. Only cells in these localizations expressed MHC II-molecules on their surface. Here also CVI-ChNL-74.2⁺ macrophages were found. In the gussets and in the interatrial *septa* CVI-ChNL-74.2⁺ cells were frequently encountered, too, but they could barely be addressed as macrophages. The CVI-ChNL-68.1⁺ cells also preferred the gussets and the deeper layers of the parabronchial wall within the parenchyma. Finally, CVI-ChNL-74.3⁺ cells were surprisingly found not only in the BALT but also diffusely scattered in the lung parenchyma and in the region of the interparabronchial septums. Within the parabronchial wall this mab produced regularly a specific reaction of the cells of the atrial epithelium.

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 2-1: Migrations- und Reifungspfade dendritischer Zellen (127)
- Abb. 2-2: Wege der MHC I-Präsentation (38)
- Abb. 5-1: Flügelhaut, HE, 40-fach
- Abb. 5-2: Dorsale Schuppenhaut, HE, 40-fach
- Abb. 5-3: Flügelhaut, mAk 16-6, 40-fach
- Abb. 5-4: Flügelhaut, mAk 16-6, 40-fach
- Abb. 5-5: Dorsale Schuppenhaut, mAk 16-6, 100-fach
- Abb. 5-6: Dorsale Schuppenhaut, mAk 16-6, 100-fach
- Abb. 5-7: Kehllappenhaut, mAk 16-6, 40-fach
- Abb. 5-8: Kehllappenhaut, mAk 16-6, 40-fach
- Abb. 5-9: Flügelhaut, mAk KUL01, 40-fach
- Abb. 5-10: Flügelhaut, mAk KUL01, 40-fach
- Abb. 5-11: Dorsale Schuppenhaut, mAk KUL01, 100-fach
- Abb. 5-12: Dorsale Schuppenhaut, mAk KUL01, 100-fach
- Abb. 5-13: Kehllappenhaut, mAk KUL01, 40-fach
- Abb. 5-14: Kehllappenhaut, mAk KUL01, 100-fach
- Abb. 5-15: Flügelhaut, mAk 2G11, 40-fach
- Abb. 5-16: Flügelhaut, mAk 2G11, 100-fach
- Abb. 5-17: Dorsale Schuppenhaut, mAk 2G11, 100-fach
- Abb. 5-18: Dorsale Schuppenhaut, mAk 2G11, 100-fach
- Abb. 5-19: Kehllappenhaut, mAk 2G11, 10-fach
- Abb. 5-20: Kehllappenhaut, mAk 2G11, 40-fach
- Abb. 5-21: Flügelhaut, mAk 3-6, 40-fach
- Abb. 5-22: Flügelhaut, mAk 3-6, 40-fach
- Abb. 5-23: Dorsale Schuppenhaut, mAk 3-6, 100-fach
- Abb. 5-24: Dorsale Schuppenhaut, mAk 3-6, 100-fach
- Abb. 5-25: Kehllappenhaut, mAk 3-6, 100-fach
- Abb. 5-26: Kehllappenhaut, mAk 3-6, 100-fach
- Abb. 5-27: Flügelhaut, mAk CVI-ChNL-68.1, 40-fach
- Abb. 5-28: Flügelhaut, mAk CVI-ChNL-68.1, 40-fach
- Abb. 5-29: Dorsale Schuppenhaut, mAk CVI-ChNL-68.1, 100-fach
- Abb. 5-30: Dorsale Schuppenhaut, mAk CVI-ChNL-68.1, 100-fach

- Abb. 5-31: Kehllappenhaut, mAk CVI-ChNL-68.1, 40-fach
- Abb. 5-32: Kehllappenhaut, mAk CVI-ChNL-68.1, 40-fach
- Abb. 5-33: Flügelhaut, mAk CVI-ChNL-74.2, 40-fach
- Abb. 5-34: Flügelhaut, mAk CVI-ChNL-74.2, 40-fach
- Abb. 5-35: Dorsale Schuppenhaut, mAk CVI-ChNL-74.2, 100-fach
- Abb. 5-36: Dorsale Schuppenhaut, mAk CVI-ChNL-74.2, 100-fach
- Abb. 5-37: Kehllappenhaut, mAk CVI-ChNL-74.2, 100-fach
- Abb. 5-38: Kehllappenhaut, mAk CVI-ChNL-74.2, 100-fach
- Abb. 5-39: Übersichtsaufnahme der Bursa, HE, 40-fach
- Abb. 5-40: Bursa, mAk 16-6, 10-fach
- Abb. 5-41: Bursa, mAk KUL01, 20-fach
- Abb. 5-42: Bursa, mAk KUL01, 100-fach
- Abb. 5-43: Bursa, mAk 2G11, 20-fach
- Abb. 5-44: Bursa, mAk 2G11, 40-fach
- Abb. 5-45: Bursa, mAk 3-6, 40-fach
- Abb. 5-46: Bursa, mAk 3-6, 100-fach
- Abb. 5-47: Bursa, mAk CVI-ChNL-68.1, 40-fach
- Abb. 5-48: Bursa, mAk CVI-ChNL-68.1, 100-fach
- Abb. 5-49: Bursa, mAk CVI-ChNL-74.2, 10-fach
- Abb. 5-50: Bursa, mAk CVI-ChNL-74.2, 40-fach
- Abb. 5-51: Bursa, mAk CVI-ChNL-74.3, 40-fach
- Abb. 5-52: Übersichtsaufnahme der Lunge, HE, 1,6-fach
- Abb. 5-53: BALT, mAk 16-6, 10-fach
- Abb. 5-54: Lungenparenchym, mAk 16-6, 40-fach
- Abb. 5-55: Lungenparenchym, mAk 16-6, 100-fach
- Abb. 5-56: BALT, mAk KUL01, 20-fach
- Abb. 5-57: Lungenparenchym, mAk KUL01, 40-fach
- Abb. 5-58: BALT, mAk LD42, 100-fach
- Abb. 5-59: Lungenparenchym, mAk LD42, 100-fach
- Abb. 5-60: BALT, mAk 3-6, 20-fach
- Abb. 5-61: Lungenparenchym, mAk 3-6, 40-fach
- Abb. 5-62: Lungenparenchym, mAk 3-6, 20-fach
- Abb. 5-63: BALT, mAk CVI-ChNL-68.1, 40-fach
- Abb. 5-64: Lungenparenchym, mAk CVI-ChNL-68.1, 40-fach

- Abb. 5-65: Lungenparenchym, mAk CVI-ChNL-68.1, 40-fach
- Abb. 5-66: Lungenparenchym, mAk CVI-ChNL-74.2, 100-fach
- Abb. 5-67: Lungenparenchym, mAk CVI-ChNL-74.2, 40-fach
- Abb. 5-68: BALT, mAk CVI-ChNL-74.3, 40-fach
- Abb. 5-69: Lungenparenchym, mAk CVI-ChNL-74.3, 40-fach
- Abb. 5-70: Lungenparenchym, mAk CVI-ChNL-74.3, 40-fach

10 TABELLENVERZEICHNIS

- Tabelle 4-1: Antikörperspezifität und Quelle
- Tabelle 4-2: Organabhängige Verdünnung der Primärantikörper
- Tabelle 5-1: Ergebnisse der histologischen Untersuchung der Haut
- Tabelle 5-2 a: Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung der Haut
- Tabelle 5-2 b: Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung der Haut
- Tabelle 5-3: Ergebnisse der histologischen Untersuchung der Bursa fabricii
- Tabelle 5-4 a: Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung der Bursa fabricii
- Tabelle 5-4 b: Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung der Bursa fabricii
- Tabelle 5-5: Ergebnisse der histologischen Untersuchung der Lunge
- Tabelle 5-6 a: Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung der Lunge
- Tabelle 5-6 b: Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung der Lunge

11 LITERATURVERZEICHNIS

1. Langerhans P. Über die nerven der menschlichen haut. *Vizchows Arch (A)* 1868:325-327.
2. Ebling FJ. Homage to Paul Langerhans. *J Invest Dermatol* 1980;75(1):3-5.
3. Breathnach AS, Silvers WK, Smith J, Heyner S. Langerhans cells in mouse skin experimentally deprived of its neural crest component. *J Invest Dermatol* 1968;50(2):147-60.
4. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973;137(5):1142-62.
5. Katz SI, Tamaki K, Sachs DH. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* 1979;282(5736):324-6.
6. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Durand I, Cella M, et al. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood* 1997;90(4):1458-70.
7. Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997;90(9):3245-87.
8. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392(6673):245-52.
9. Green I, Stingl G, Shevach EM, Katz SI. Antigen presentation and allogeneic stimulation by Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 1980;75(1):44-5.
10. Steiner G, Wolff K, Pehamberger H, Stingl G. Epidermal cells as accessory cells in the generation of allo-reactive and hapten-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses. *J Immunol* 1985;134(2):736-41.
11. Romani N, Koide S, Crowley M, Witmer-Pack M, Livingstone AM, Fathman CG, et al. Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 1989;169(3):1169-78.
12. Sallusto F, Lanzavecchia A. 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* 1994;179(4):1109-18.
13. Cyster JG. Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs. *J Exp Med* 1999;189(3):447-50.

14. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000;12(2):121-7.
15. Wilson NS, Villadangos JA. Lymphoid organ dendritic cells: beyond the Langerhans cells paradigm. *Immunol Cell Biol* 2004;82(1):91-8.
16. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1992;176(6):1693-702.
17. Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 1992;360(6401):258-61.
18. Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994;180(1):83-93.
19. Strobl H, Bello-Fernandez C, Riedl E, Pickl WF, Majdic O, Lyman SD, et al. flt3 ligand in cooperation with transforming growth factor-beta1 potentiates in vitro development of Langerhans-type dendritic cells and allows single-cell dendritic cell cluster formation under serum-free conditions. *Blood* 1997;90(4):1425-34.
20. Maraskovsky E, Brasel K, Teepe M, Roux ER, Lyman SD, Shortman K, et al. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med* 1996;184(5):1953-62.
21. Borkowski TA, Letterio JJ, Farr AG, Udey MC. A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 1996;184(6):2417-22.
22. Pulendran B, Lingappa J, Kennedy MK, Smith J, Teepe M, Rudensky A, et al. Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *J Immunol* 1997;159(5):2222-31.
23. O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, Swiggard WJ, Betjes M, Bhardwaj N, et al. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 1994;82(3):487-93.
24. Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 1997;185(6):1101-11.

25. Strobl H, Scheinecker C, Riedl E, Csmarits B, Bello-Fernandez C, Pickl WF, et al. Identification of CD68⁺lin⁻ peripheral blood cells with dendritic precursor characteristics. *J Immunol* 1998;161(2):740-8.
26. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, et al. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 1999;5(8):919-23.
27. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999;284(5421):1835-7.
28. Le Bon A, Etchart N, Rossmann C, Ashton M, Hou S, Gewert D, et al. Cross-priming of CD8⁺ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat Immunol* 2003;4(10):1009-15.
29. O'Keeffe M, Hochrein H, Vremec D, Caminschi I, Miller JL, Anders EM, et al. Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8⁽⁺⁾ dendritic cells only after microbial stimulus. *J Exp Med* 2002;196(10):1307-19.
30. Bruno L, Res P, Dessing M, Cella M, Spits H. Identification of a committed T cell precursor population in adult human peripheral blood. *J Exp Med* 1997;185(5):875-84.
31. Res PC, Couwenberg F, Vyth-Dreese FA, Spits H. Expression of pTalpha mRNA in a committed dendritic cell precursor in the human thymus. *Blood* 1999;94(8):2647-57.
32. Spits H, Couwenberg F, Bakker AQ, Weijer K, Uittenbogaart CH. Id2 and Id3 inhibit development of CD34⁽⁺⁾ stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2. *J Exp Med* 2000;192(12):1775-84.
33. Kohrgruber N, Halanek N, Groger M, Winter D, Rappersberger K, Schmitt-Egenolf M, et al. Survival, maturation, and function of CD11c⁻ and CD11c⁺ peripheral blood dendritic cells are differentially regulated by cytokines. *J Immunol* 1999;163(6):3250-9.
34. Cella M, Facchetti F, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol* 2000;1(4):305-10.
35. Vremec D, Zorbas M, Scollay R, Saunders DJ, Ardavin CF, Wu L, et al. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J Exp Med* 1992;176(1):47-58.
36. Vremec D, Pooley J, Hochrein H, Wu L, Shortman K. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol* 2000;164(6):2978-86.

37. Henri S, Vremec D, Kamath A, Waithman J, Williams S, Benoist C, et al. The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J Immunol* 2001;167(2):741-8.
38. Heath WR, Belz GT, Behrens GM, Smith CM, Forehan SP, Parish IA, et al. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* 2004;199:9-26.
39. Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmeer M, Liu Y, et al. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 2000;12(1):71-81.
40. Clark SL, Jr. The reticulum of lymph nodes in mice studied with the electron microscope. *Am J Anat* 1962;110:217-57.
41. Moe RE. Fine structure of the reticulum and sinuses of lymph nodes. *Am J Anat* 1963;112:311-335.
42. Mitchell J, Abbot A. Ultrastructure of the antigen-retaining reticulum of lymph node follicles as shown by high-resolution autoradiography. *Nature* 1965;208(9):500-2.
43. Tew JG, Thorbecke GJ, Steinman RM. Dendritic cells in the immune response: characteristics and recommended nomenclature (A report from the Reticuloendothelial Society Committee on Nomenclature). *J Reticuloendothel Soc* 1982;31(5):371-80.
44. Yoshida K, van den Berg TK, Dijkstra CD. Two functionally different follicular dendritic cells in secondary lymphoid follicles of mouse spleen, as revealed by CR1/2 and FcR gamma II-mediated immune-complex trapping. *Immunology* 1993;80(1):34-9.
45. Ritter MA, Boyd RL. Development in the thymus: it takes two to tango. *Immunol Today* 1993;14(9):462-9.
46. Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 2004;116(6):769-78.
47. MacLennan IC, Gray D. Antigen-driven selection of virgin and memory B cells. *Immunol Rev* 1986;91:61-85.
48. Cerny A, Zinkernagel RM, Groscurth P. Development of follicular dendritic cells in lymph nodes of B-cell-depleted mice. *Cell Tissue Res* 1988;254(2):449-54.
49. Kapasi ZF, Burton GF, Shultz LD, Tew JG, Szakal AK. Induction of functional follicular dendritic cell development in severe combined immunodeficiency mice. Influence of B and T cells. *J Immunol* 1993;150(7):2648-58.
50. Yoshida K, Kaji M, Takahashi T, van den Berg TK, Dijkstra CD. Host origin of follicular dendritic cells induced in the spleen of SCID mice after transfer of allogeneic lymphocytes. *Immunology* 1995;84(1):117-26.

51. Kawabe T, Naka T, Yoshida K, Tanaka T, Fujiwara H, Suematsu S, et al. The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1994;1(3):167-78.
52. Renshaw BR, Fanslow WC, 3rd, Armitage RJ, Campbell KA, Liggitt D, Wright B, et al. Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice. *J Exp Med* 1994;180(5):1889-900.
53. Pasparakis M, Alexopoulou L, Episkopou V, Kollias G. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J Exp Med* 1996;184(4):1397-411.
54. Koni PA, Sacca R, Lawton P, Browning JL, Ruddle NH, Flavell RA. Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins alpha and beta revealed in lymphotoxin beta-deficient mice. *Immunity* 1997;6(4):491-500.
55. Matsumoto M, Fu YX, Molina H, Huang G, Kim J, Thomas DA, et al. Distinct roles of lymphotoxin alpha and the type I tumor necrosis factor (TNF) receptor in the establishment of follicular dendritic cells from non-bone marrow-derived cells. *J Exp Med* 1997;186(12):1997-2004.
56. Rahman ZS, Rao SP, Kalled SL, Manser T. Normal induction but attenuated progression of germinal center responses in BAFF and BAFF-R signaling-deficient mice. *J Exp Med* 2003;198(8):1157-69.
57. Vora KA, Wang LC, Rao SP, Liu ZY, Majeau GR, Cutler AH, et al. Cutting edge: germinal centers formed in the absence of B cell-activating factor belonging to the TNF family exhibit impaired maturation and function. *J Immunol* 2003;171(2):547-51.
58. Asselin-Paturel C, Boonstra A, Dalod M, Durand I, Yessaad N, Dezutter-Dambuyant C, et al. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* 2001;2(12):1144-50.
59. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001;194(6):863-9.
60. Nakano H, Yanagita M, Gunn MD. CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2001;194(8):1171-8.

61. Hochrein H, Shortman K, Vremec D, Scott B, Hertzog P, O'Keeffe M. Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets. *J Immunol* 2001;166(9):5448-55.
62. Pulendran B, Smith JL, Caspary G, Brasel K, Pettit D, Maraskovsky E, et al. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(3):1036-41.
63. De Smedt T, Pajak B, Muraille E, Lespagnard L, Heinen E, De Baetselier P, et al. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med* 1996;184(4):1413-24.
64. Steinman RM, Pack M, Inaba K. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol Rev* 1997;156:25-37.
65. Curtsinger JM, Lins DC, Mescher MF. Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *J Exp Med* 2003;197(9):1141-51.
66. Vieira PL, de Jong EC, Wierenga EA, Kapsenberg ML, Kalinski P. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *J Immunol* 2000;164(9):4507-12.
67. den Haan JM, Lehar SM, Bevan MJ. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* 2000;192(12):1685-96.
68. Belz GT, Behrens GM, Smith CM, Miller JF, Jones C, Lejon K, et al. The CD8alpha(+) dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens. *J Exp Med* 2002;196(8):1099-104.
69. Scheinecker C, McHugh R, Shevach EM, Germain RN. Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. *J Exp Med* 2002;196(8):1079-90.
70. Romani N, Holzmann S, Tripp CH, Koch F, Stoitzner P. Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. *Apmis* 2003;111(7-8):725-40.
71. Garg S, Oran A, Wajchman J, Sasaki S, Maris CH, Kapp JA, et al. Genetic tagging shows increased frequency and longevity of antigen-presenting, skin-derived dendritic cells in vivo. *Nat Immunol* 2003;4(9):907-12.
72. Allan RS, Smith CM, Belz GT, van Lint AL, Wakim LM, Heath WR, et al. Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science* 2003;301(5641):1925-8.

73. Zhao X, Deak E, Soderberg K, Linehan M, Spezzano D, Zhu J, et al. Vaginal submucosal dendritic cells, but not Langerhans cells, induce protective Th1 responses to herpes simplex virus-2. *J Exp Med* 2003;197(2):153-62.
74. Behrens G, Li M, Smith CM, Belz GT, Mintern J, Carbone FR, et al. Helper T cells, dendritic cells and CTL Immunity. *Immunol Cell Biol* 2004;82(1):84-90.
75. Kosco-Vilbois MH. Are follicular dendritic cells really good for nothing? *Nat Rev Immunol* 2003;3(9):764-9.
76. Kosco MH, Szakal AK, Tew JG. In vivo obtained antigen presented by germinal center B cells to T cells in vitro. *J Immunol* 1988;140(2):354-60.
77. Wu J, Qin D, Burton GF, Szakal AK, Tew JG. Follicular dendritic cell-derived antigen and accessory activity in initiation of memory IgG responses in vitro. *J Immunol* 1996;157(8):3404-11.
78. Vora KA, Ravetch JV, Manser T. Amplified follicular immune complex deposition in mice lacking the Fc receptor gamma-chain does not alter maturation of the B cell response. *J Immunol* 1997;159(5):2116-24.
79. Hannum LG, Haberman AM, Anderson SM, Shlomchik MJ. Germinal center initiation, variable gene region hypermutation, and mutant B cell selection without detectable immune complexes on follicular dendritic cells. *J Exp Med* 2000;192(7):931-42.
80. Kosco MH, Pflugfelder E, Gray D. Follicular dendritic cell-dependent adhesion and proliferation of B cells in vitro. *J Immunol* 1992;148(8):2331-9.
81. Burton GF, Conrad DH, Szakal AK, Tew JG. Follicular dendritic cells and B cell costimulation. *J Immunol* 1993;150(1):31-8.
82. Liu YJ, Joshua DE, Williams GT, Smith CA, Gordon J, MacLennan IC. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 1989;342(6252):929-31.
83. Martinez-Valdez H, Guret C, de Bouteiller O, Fugier I, Banchereau J, Liu YJ. Human germinal center B cells express the apoptosis-inducing genes Fas, c-myc, P53, and Bax but not the survival gene bcl-2. *J Exp Med* 1996;183(3):971-7.
84. Liu YJ, Johnson GD, Gordon J, MacLennan IC. Germinal centres in T-cell-dependent antibody responses. *Immunol Today* 1992;13(1):17-21.
85. Lindhout E, Mevissen ML, Kwekkeboom J, Tager JM, de Groot C. Direct evidence that human follicular dendritic cells (FDC) rescue germinal centre B cells from death by apoptosis. *Clin Exp Immunol* 1993;91(2):330-6.

86. Lindhout E, Lakeman A, de Groot C. Follicular dendritic cells inhibit apoptosis in human B lymphocytes by a rapid and irreversible blockade of preexisting endonuclease. *J Exp Med* 1995;181(6):1985-95.
87. van Eijk M, de Groot C. Germinal center B cell apoptosis requires both caspase and cathepsin activity. *J Immunol* 1999;163(5):2478-82.
88. Hennino A, Berard M, Krammer PH, Defrance T. FLICE-inhibitory protein is a key regulator of germinal center B cell apoptosis. *J Exp Med* 2001;193(4):447-58.
89. Hollmann C, Gerdes J. Follicular dendritic cells and T cells: nurses and executioners in the germinal centre reaction. *J Pathol* 1999;189(2):147-9.
90. Schwarz YX, Yang M, Qin D, Wu J, Jarvis WD, Grant S, et al. Follicular dendritic cells protect malignant B cells from apoptosis induced by anti-Fas and antineoplastic agents. *J Immunol* 1999;163(12):6442-7.
91. Rothstein TL, Wang JK, Panka DJ, Foote LC, Wang Z, Stanger B, et al. Protection against Fas-dependent Th1-mediated apoptosis by antigen receptor engagement in B cells. *Nature* 1995;374(6518):163-5.
92. Foote LC, Marshak-Rothstein A, Rothstein TL. Tolerant B lymphocytes acquire resistance to Fas-mediated apoptosis after treatment with interleukin 4 but not after treatment with specific antigen unless a surface immunoglobulin threshold is exceeded. *J Exp Med* 1998;187(6):847-53.
93. Verbeke CS, Wenthe U, Zentgraf H. Fas ligand expression in the germinal centre. *J Pathol* 1999;189(2):155-60.
94. Hur DY, Kim DJ, Kim S, Kim YI, Cho D, Lee DS, et al. Role of follicular dendritic cells in the apoptosis of germinal center B cells. *Immunol Lett* 2000;72(2):107-11.
95. van Eijk M, Medema JP, de Groot C. Cutting edge: cellular Fas-associated death domain-like IL-1-converting enzyme-inhibitory protein protects germinal center B cells from apoptosis during germinal center reactions. *J Immunol* 2001;166(11):6473-6.
96. van Eijk M, Defrance T, Hennino A, de Groot C. Death-receptor contribution to the germinal-center reaction. *Trends Immunol* 2001;22(12):677-82.
97. Rescigno M, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells at the end of the millennium. *Immunol Cell Biol* 1999;77(5):404-10.
98. Sallusto F, Lanzavecchia A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev* 2000;177:134-40.
99. Miller MD, Krangel MS. Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit Rev Immunol* 1992;12(1-2):17-46.

100. Rollins BJ. Chemokines. *Blood* 1997;90(3):909-28.
101. Kunkel SL. Through the looking glass: the diverse in vivo activities of chemokines. *J Clin Invest* 1999;104(10):1333-4.
102. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998;392(6676):565-8.
103. Cyster JG. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 1999;286(5447):2098-102.
104. Sozzani S, Sallusto F, Luini W, Zhou D, Piemonti L, Allavena P, et al. Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a, and a distinct set of chemokines. *J Immunol* 1995;155(7):3292-5.
105. Sozzani S, Luini W, Borsatti A, Polentarutti N, Zhou D, Piemonti L, et al. Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines. *J Immunol* 1997;159(4):1993-2000.
106. Dieu-Nosjean MC, Vicari A, Lebecque S, Caux C. Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. *J Leukoc Biol* 1999;66(2):252-62.
107. Vecchi A, Massimiliano L, Ramponi S, Luini W, Bernasconi S, Bonecchi R, et al. Differential responsiveness to constitutive vs. inducible chemokines of immature and mature mouse dendritic cells. *J Leukoc Biol* 1999;66(3):489-94.
108. Anderson DC, Miller LJ, Schmalstieg FC, Rothlein R, Springer TA. Contributions of the Mac-1 glycoprotein family to adherence-dependent granulocyte functions: structure-function assessments employing subunit-specific monoclonal antibodies. *J Immunol* 1986;137(1):15-27.
109. Sozzani S, Longoni D, Bonecchi R, Luini W, Bersani L, D'Amico G, et al. Human monocyte-derived and CD34+ cell-derived dendritic cells express functional receptors for platelet activating factor. *FEBS Lett* 1997;418(1-2):98-100.
110. Sallusto F, Palermo B, Lenig D, Miettinen M, Matikainen S, Julkunen I, et al. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur J Immunol* 1999;29(5):1617-25.
111. Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait-Yahia S, et al. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 1998;188(2):373-86.
112. Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, et al. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* 1998;161(3):1083-6.

113. Yoshida R, Nagira M, Kitaura M, Imagawa N, Imai T, Yoshie O. Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7. *J Biol Chem* 1998;273(12):7118-22.
114. Burgstahler R, Kempkes B, Steube K, Lipp M. Expression of the chemokine receptor BLR2/EBI1 is specifically transactivated by Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;215(2):737-43.
115. Forster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Muller I, Wolf E, et al. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 1999;99(1):23-33.
116. Yang D, Chen Q, Stoll S, Chen X, Howard OM, Oppenheim JJ. Differential regulation of responsiveness to fMLP and C5a upon dendritic cell maturation: correlation with receptor expression. *J Immunol* 2000;165(5):2694-702.
117. Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Mantovani A. The role of chemokines in the regulation of dendritic cell trafficking. *J Leukoc Biol* 1999;66(1):1-9.
118. Dieu-Nosjean MC, Massacrier C, Homey B, Vanbervliet B, Pin JJ, Vicari A, et al. Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. *J Exp Med* 2000;192(5):705-18.
119. Cook DN, Prosser DM, Forster R, Zhang J, Kuklin NA, Abbondanzo SJ, et al. CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue. *Immunity* 2000;12(5):495-503.
120. Iwasaki A, Kelsall BL. Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine. *J Exp Med* 2000;191(8):1381-94.
121. Foti M, Granucci F, Aggujaro D, Liboi E, Luini W, Minardi S, et al. Upon dendritic cell (DC) activation chemokines and chemokine receptor expression are rapidly regulated for recruitment and maintenance of DC at the inflammatory site. *Int Immunol* 1999;11(6):979-86.
122. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 2000;18:593-620.
123. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* 1997;277(5334):2005-7.

124. Ngo VN, Tang HL, Cyster JG. Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive T cells and activated B cells. *J Exp Med* 1998;188(1):181-91.
125. Tang HL, Cyster JG. Chemokine Up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells. *Science* 1999;284(5415):819-22.
126. Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* 2000;1(4):311-6.
127. Lipscomb MF, Masten BJ. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* 2002;82(1):97-130.
128. Steinman RM, Swanson J. The endocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med* 1995;182(2):283-8.
129. Harshyne LA, Watkins SC, Gambotto A, Barratt-Boyes SM. Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *J Immunol* 2001;166(6):3717-23.
130. Larsson M, Fonteneau JF, Bhardwaj N. Dendritic cells resurrect antigens from dead cells. *Trends Immunol* 2001;22(3):141-8.
131. Castellino F, Germain RN. Extensive trafficking of MHC class II-invariant chain complexes in the endocytic pathway and appearance of peptide-loaded class II in multiple compartments. *Immunity* 1995;2(1):73-88.
132. Shi GP, Bryant RA, Riese R, Verhelst S, Driessen C, Li Z, et al. Role for cathepsin F in invariant chain processing and major histocompatibility complex class II peptide loading by macrophages. *J Exp Med* 2000;191(7):1177-86.
133. Morris P, Shaman J, Attaya M, Amaya M, Goodman S, Bergman C, et al. An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules. *Nature* 1994;368(6471):551-4.
134. Turley SJ, Inaba K, Garrett WS, Ebersold M, Unternaehrer J, Steinman RM, et al. Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science* 2000;288(5465):522-7.
135. Pamer E, Cresswell P. Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 1998;16:323-58.
136. Basu S, Srivastava PK. Calreticulin, a peptide-binding chaperone of the endoplasmic reticulum, elicits tumor- and peptide-specific immunity. *J Exp Med* 1999;189(5):797-802.

137. Pfeifer JD, Wick MJ, Roberts RL, Findlay K, Normark SJ, Harding CV. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* 1993;361(6410):359-62.
138. Reis e Sousa C, Germain RN. Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis. *J Exp Med* 1995;182(3):841-51.
139. Ke Y, Kapp JA. Exogenous antigens gain access to the major histocompatibility complex class I processing pathway in B cells by receptor-mediated uptake. *J Exp Med* 1996;184(3):1179-84.
140. Limmer A, Ohl J, Kurts C, Ljunggren HG, Reiss Y, Groettrup M, et al. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8⁺ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* 2000;6(12):1348-54.
141. Savinov AY, Wong FS, Stonebraker AC, Chervonsky AV. Presentation of antigen by endothelial cells and chemoattraction are required for homing of insulin-specific CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 2003;197(5):643-56.
142. Debrick JE, Campbell PA, Staerz UD. Macrophages as accessory cells for class I MHC-restricted immune responses. *J Immunol* 1991;147(9):2846-51.
143. Kovacsovics-Bankowski M, Clark K, Benacerraf B, Rock KL. Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(11):4942-6.
144. Rock KL, Rothstein L, Gamble S, Fleischacker C. Characterization of antigen-presenting cells that present exogenous antigens in association with class I MHC molecules. *J Immunol* 1993;150(2):438-46.
145. Iyoda T, Shimoyama S, Liu K, Omatsu Y, Akiyama Y, Maeda Y, et al. The CD8⁺ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J Exp Med* 2002;195(10):1289-302.
146. Valdez Y, Mah W, Winslow MM, Xu L, Ling P, Townsend SE. Major histocompatibility complex class II presentation of cell-associated antigen is mediated by CD8 α ⁺ dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 2002;195(6):683-94.
147. Ackerman AL, Kyritsis C, Tampe R, Cresswell P. Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(22):12889-94.

148. Guermonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P, Amigorena S. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 2003;425(6956):397-402.
149. Houde M, Bertholet S, Gagnon E, Brunet S, Goyette G, Laplante A, et al. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 2003;425(6956):402-6.
150. Cresswell P, Bangia N, Dick T, Diedrich G. The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol Rev* 1999;172:21-8.
151. Wiertz EJ, Tortorella D, Bogyo M, Yu J, Mothes W, Jones TR, et al. Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* 1996;384(6608):432-8.
152. Matlack KE, Mothes W, Rapoport TA. Protein translocation: tunnel vision. *Cell* 1998;92(3):381-90.
153. Romisch K. Surfing the Sec61 channel: bidirectional protein translocation across the ER membrane. *J Cell Sci* 1999;112 (Pt 23):4185-91.
154. Staerz UD, Karasuyama H, Garner AM. Cytotoxic T lymphocytes against a soluble protein. *Nature* 1987;329(6138):449-51.
155. Pooley JL, Heath WR, Shortman K. Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8⁻ dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8⁺ dendritic cells. *J Immunol* 2001;166(9):5327-30.
156. Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, Rodriguez A, Thery C, Rescigno M, et al. Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med* 1999;189(2):371-80.
157. den Haan JM, Bevan MJ. Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8⁽⁺⁾ and CD8⁽⁻⁾ dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 2002;196(6):817-27.
158. Belkaid Y, Von Stebut E, Mendez S, Lira R, Caler E, Bertholet S, et al. CD8⁺ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J Immunol* 2002;168(8):3992-4000.
159. Bevan MJ. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med* 1976;143(5):1283-8.
160. Gooding LR, Edwards CB. H-2 antigen requirements in the in vitro induction of SV40-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1980;124(3):1258-62.

161. Carbone FR, Bevan MJ. Class I-restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigen in vivo. *J Exp Med* 1990;171(2):377-87.
162. Brenner M, Porcelli S. Antigen presentation: a balanced diet. *Science* 1997;277(5324):332.
163. Shinkai K, Locksley RM. CD1, tuberculosis, and the evolution of major histocompatibility complex molecules. *J Exp Med* 2000;191(6):907-14.
164. Zeng Z, Castano AR, Segelke BW, Stura EA, Peterson PA, Wilson IA. Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. *Science* 1997;277(5324):339-45.
165. Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat Immunol* 2001;2(3):203-9.
166. Schwartz RH. Immunology. It takes more than two to tango. *Nature* 2001;409(6816):31-2.
167. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1994;1(5):405-13.
168. Swallow MM, Wallin JJ, Sha WC. B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNFalpha. *Immunity* 1999;11(4):423-32.
169. Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, Horan T, et al. T-cell costimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 1999;402(6763):827-32.
170. Kopf M, Coyle AJ, Schmitz N, Barner M, Oxenius A, Gallimore A, et al. Inducible costimulator protein (ICOS) controls T helper cell subset polarization after virus and parasite infection. *J Exp Med* 2000;192(1):53-61.
171. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, et al. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 1999;397(6716):263-6.
172. Dong C, Juedes AE, Temann UA, Shresta S, Allison JP, Ruddle NH, et al. ICOS costimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 2001;409(6816):97-101.
173. McAdam AJ, Greenwald RJ, Levin MA, Chernova T, Malenkovich N, Ling V, et al. ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature* 2001;409(6816):102-5.
174. Tafuri A, Shahinian A, Blatt F, Yoshinaga SK, Jordana M, Wakeham A, et al. ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature* 2001;409(6816):105-9.

175. Chapoval AI, Ni J, Lau JS, Wilcox RA, Flies DB, Liu D, et al. B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nat Immunol* 2001;2(3):269-74.
176. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, et al. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 1994;180(4):1263-72.
177. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 1996;184(2):747-52.
178. Weinberg AD, Vella AT, Croft M. OX-40: life beyond the effector T cell stage. *Semin Immunol* 1998;10(6):471-80.
179. Kopf M, Ruedl C, Schmitz N, Gallimore A, Lefrang K, Ecabert B, et al. OX40-deficient mice are defective in Th cell proliferation but are competent in generating B cell and CTL Responses after virus infection. *Immunity* 1999;11(6):699-708.
180. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811.
181. Bachmann MF, McKall-Faienza K, Schmits R, Bouchard D, Beach J, Speiser DE, et al. Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation. *Immunity* 1997;7(4):549-57.
182. Masten BJ, Yates JL, Pollard Koga AM, Lipscomb MF. Characterization of accessory molecules in murine lung dendritic cell function: roles for CD80, CD86, CD54, and CD40L. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;16(3):335-42.
183. Salomon B, Bluestone JA. LFA-1 interaction with ICAM-1 and ICAM-2 regulates Th2 cytokine production. *J Immunol* 1998;161(10):5138-42.
184. Steinman RM. DC-SIGN: a guide to some mysteries of dendritic cells. *Cell* 2000;100(5):491-4.
185. Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y, et al. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 2000;100(5):575-85.
186. Geijtenbeek TB, Krooshoop DJ, Bleijs DA, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Grabovsky V, et al. DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat Immunol* 2000;1(4):353-7.

187. Lanzavecchia A, Sallusto F. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 2000;290(5489):92-7.
188. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999;401(6754):708-12.
189. Lau LL, Jamieson BD, Somasundaram T, Ahmed R. Cytotoxic T-cell memory without antigen. *Nature* 1994;369(6482):648-52.
190. Ku CC, Murakami M, Sakamoto A, Kappler J, Marrack P. Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines. *Science* 2000;288(5466):675-8.
191. Blauvelt A, Asada H, Klaus-Kovtun V, Altman DJ, Lucey DR, Katz SI. Interleukin-15 mRNA is expressed by human keratinocytes Langerhans cells, and blood-derived dendritic cells and is downregulated by ultraviolet B radiation. *J Invest Dermatol* 1996;106(5):1047-52.
192. Jonuleit H, Wiedemann K, Muller G, Degwert J, Hoppe U, Knop J, et al. Induction of IL-15 messenger RNA and protein in human blood-derived dendritic cells: a role for IL-15 in attraction of T cells. *J Immunol* 1997;158(6):2610-5.
193. Josien R, Wong BR, Li HL, Steinman RM, Choi Y. TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells. *J Immunol* 1999;162(5):2562-8.
194. van Essen D, Dullforce P, Brocker T, Gray D. Cellular interactions involved in Th cell memory. *J Immunol* 2000;165(7):3640-6.
195. Iezzi G, Karjalainen K, Lanzavecchia A. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 1998;8(1):89-95.
196. Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 1997;388(6644):782-7.
197. Heufler C, Koch F, Stanzl U, Topar G, Wysocka M, Trinchieri G, et al. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol* 1996;26(3):659-68.
198. Iezzi G, Scotet E, Scheidegger D, Lanzavecchia A. The interplay between the duration of TCR and cytokine signaling determines T cell polarization. *Eur J Immunol* 1999;29(12):4092-101.

199. van der Pouw Kraan TC, Boeije LC, Smeenk RJ, Wijdenes J, Aarden LA. Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *J Exp Med* 1995;181(2):775-9.
200. Kalinski P, Hilkens CM, Snijders A, Snijdwint FG, Kapsenberg ML. IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J Immunol* 1997;159(1):28-35.
201. Whittaker DS, Bahjat KS, Moldawer LL, Clare-Salzler MJ. Autoregulation of human monocyte-derived dendritic cell maturation and IL-12 production by cyclooxygenase-2-mediated prostanoid production. *J Immunol* 2000;165(8):4298-304.
202. Corinti S, Albanesi C, la Sala A, Pastore S, Girolomoni G. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J Immunol* 2001;166(7):4312-8.
203. d'Ostiani CF, Del Sero G, Bacci A, Montagnoli C, Spreca A, Mencacci A, et al. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *J Exp Med* 2000;191(10):1661-74.
204. Hilkens CM, Kalinski P, de Boer M, Kapsenberg ML. Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naive T-helper cells toward the Th1 phenotype. *Blood* 1997;90(5):1920-6.
205. Snijders A, Kalinski P, Hilkens CM, Kapsenberg ML. High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *Int Immunol* 1998;10(11):1593-8.
206. Brocker T, Riedinger M, Karjalainen K. Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med* 1997;185(3):541-50.
207. Brocker T. The role of dendritic cells in T cell selection and survival. *J Leukoc Biol* 1999;66(2):331-5.
208. Zinkernagel RM, Althage A. On the role of thymic epithelium vs. bone marrow-derived cells in repertoire selection of T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(14):8092-7.
209. Vendetti S, Chai JG, Dyson J, Simpson E, Lombardi G, Lechler R. Anergic T cells inhibit the antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol* 2000;165(3):1175-81.
210. Hoyne GF, Tan K, Corsin-Jimenez M, Wahl K, Stewart M, Howie SE, et al. Immunological tolerance to inhaled antigen. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(4 Pt 2):S169-74.

211. Smith KM, Eaton AD, Finlayson LM, Garside P. Oral tolerance. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(4 Pt 2):S175-8.
212. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;389(6652):737-42.
213. Dubois B, Bridon JM, Fayette J, Barthelemy C, Banchereau J, Caux C, et al. Dendritic cells directly modulate B cell growth and differentiation. *J Leukoc Biol* 1999;66(2):224-30.
214. Bjorck P, Flores-Romo L, Liu YJ. Human interdigitating dendritic cells directly stimulate CD40-activated naive B cells. *Eur J Immunol* 1997;27(5):1266-74.
215. Dubois B, Massacrier C, Vanbervliet B, Fayette J, Briere F, Banchereau J, et al. Critical role of IL-12 in dendritic cell-induced differentiation of naive B lymphocytes. *J Immunol* 1998;161(5):2223-31.
216. Wykes M, Pombo A, Jenkins C, MacPherson GG. Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response. *J Immunol* 1998;161(3):1313-9.
217. Steinman RM, Germain RN. Antigen presentation and related immunological aspects of HIV-1 vaccines. *Aids* 1998;12 Suppl A:S97-112.
218. Reis e Sousa C, Sher A, Kaye P. The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. *Curr Opin Immunol* 1999;11(4):392-9.
219. Donnelly JJ, Liu MA, Ulmer JB. Antigen presentation and DNA vaccines. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(4 Pt 2):S190-3.
220. Bouloc A, Walker P, Grivel JC, Vogel JC, Katz SI. Immunization through dermal delivery of protein-encoding DNA: a role for migratory dendritic cells. *Eur J Immunol* 1999;29(2):446-54.
221. Thomson AW, Lu L. Dendritic cells as regulators of immune reactivity: implications for transplantation. *Transplantation* 1999;68(1):1-8.
222. Fairchild PJ, Waldmann H. Dendritic cells and prospects for transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol* 2000;12(5):528-35.
223. Morelli AE, Thomson AW. Role of dendritic cells in the immune response against allografts. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000;9(6):607-13.
224. Larsen CP, Morris PJ, Austyn JM. Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens. A novel pathway for initiation of rejection. *J Exp Med* 1990;171(1):307-14.

225. Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, Ildstad S, Ricordi C, Trucco M. Cell migration, chimerism, and graft acceptance. *Lancet* 1992;339(8809):1579-82.
226. Austyn JM, Hankins DF, Larsen CP, Morris PJ, Rao AS, Roake JA. Isolation and characterization of dendritic cells from mouse heart and kidney. *J Immunol* 1994;152(5):2401-10.
227. Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, Murase N, Ricordi C, Ildstad S, et al. Cell migration and chimerism after whole-organ transplantation: the basis of graft acceptance. *Hepatology* 1993;17(6):1127-52.
228. Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* 1999;5(11):1249-55.
229. Thomson AW, Lu L. Are dendritic cells the key to liver transplant tolerance? *Immunol Today* 1999;20(1):27-32.
230. Khoury SJ, Gallon L, Verburg RR, Chandraker A, Peach R, Linsley PS, et al. Ex vivo treatment of antigen-presenting cells with CTLA4Ig and encephalitogenic peptide prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Immunol* 1996;157(8):3700-5.
231. Lu L, Li W, Fu F, Chambers FG, Qian S, Fung JJ, et al. Blockade of the CD40-CD40 ligand pathway potentiates the capacity of donor-derived dendritic cell progenitors to induce long-term cardiac allograft survival. *Transplantation* 1997;64(12):1808-15.
232. Lu L, Qian S, Hershberger PA, Rudert WA, Lynch DH, Thomson AW. Fas ligand (CD95L) and B7 expression on dendritic cells provide counter-regulatory signals for T cell survival and proliferation. *J Immunol* 1997;158(12):5676-84.
233. Qian S, Lu L, Fu F, Li Y, Li W, Starzl TE, et al. Apoptosis within spontaneously accepted mouse liver allografts: evidence for deletion of cytotoxic T cells and implications for tolerance induction. *J Immunol* 1997;158(10):4654-61.
234. Li Y, Li XC, Zheng XX, Wells AD, Turka LA, Strom TB. Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nat Med* 1999;5(11):1298-302.
235. Wells AD, Li XC, Li Y, Walsh MC, Zheng XX, Wu Z, et al. Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance. *Nat Med* 1999;5(11):1303-7.
236. Fanger NA, Maliszewski CR, Schooley K, Griffith TS. Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Exp Med* 1999;190(8):1155-64.

237. Gao Y, Herndon JM, Zhang H, Griffith TS, Ferguson TA. Antiinflammatory effects of CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis. *J Exp Med* 1998;188(5):887-96.
238. Lee JI, Ganster RW, Geller DA, Burckart GJ, Thomson AW, Lu L. Cyclosporine A inhibits the expression of costimulatory molecules on in vitro-generated dendritic cells: association with reduced nuclear translocation of nuclear factor kappa B. *Transplantation* 1999;68(9):1255-63.
239. Gaschet J, Lim A, Liem L, Vivien R, Hallet MM, Harousseau JL, et al. Acute graft versus host disease due to T lymphocytes recognizing a single HLA-DPB1*0501 mismatch. *J Clin Invest* 1996;98(1):100-7.
240. Murphy WJ, Blazar BR. New strategies for preventing graft-versus-host disease. *Curr Opin Immunol* 1999;11(5):509-15.
241. Aversa F, Tabilio A, Velardi A, Cunningham I, Terenzi A, Falzetti F, et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med* 1998;339(17):1186-93.
242. Yu C, Seidel K, Nash RA, Deeg HJ, Sandmaier BM, Barsoukov A, et al. Synergism between mycophenolate mofetil and cyclosporine in preventing graft-versus-host disease among lethally irradiated dogs given DLA-nonidentical unrelated marrow grafts. *Blood* 1998;91(7):2581-7.
243. Schuler G, Schuler-Thurner B, Steinman RM. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 2003;15(2):138-47.
244. Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Munz C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 2002;195(3):343-51.
245. Fujii S, Shimizu K, Kronenberg M, Steinman RM. Prolonged IFN-gamma-producing NKT response induced with alpha-galactosylceramide-loaded DCs. *Nat Immunol* 2002;3(9):867-74.
246. Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2002;2(8):569-79.
247. Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 2001;194(6):769-79.
248. Dunbar PR, Chen JL, Chao D, Rust N, Teisserenc H, Ogg GS, et al. Cutting edge: rapid cloning of tumor-specific CTL suitable for adoptive immunotherapy of melanoma. *J Immunol* 1999;162(12):6959-62.

249. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 2002;298(5594):850-4.
250. Semper AE, Hartley JA. Dendritic cells in the lung: what is their relevance to asthma? *Clin Exp Allergy* 1996;26(5):485-90.
251. Lipscomb MF, Wilder JA. Immune dysregulation as a cause for allergic asthma. *Curr Opin Pulm Med* 1999;5(1):10-20.
252. Novak N, Haberstock J, Geiger E, Bieber T. Dendritic cells in allergy. *Allergy* 1999;54(8):792-803.
253. Lipscomb MF, Bice DE, Lyons CR, Schuyler MR, Wilkes D. The regulation of pulmonary immunity. *Adv Immunol* 1995;59:369-455.
254. Holt PG, Haining S, Nelson DJ, Sedgwick JD. Origin and steady-state turnover of class II MHC-bearing dendritic cells in the epithelium of the conducting airways. *J Immunol* 1994;153(1):256-61.
255. McWilliam AS, Nelson D, Thomas JA, Holt PG. Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. *J Exp Med* 1994;179(4):1331-6.
256. Gong JL, McCarthy KM, Telford J, Tamatani T, Miyasaka M, Schneeberger EE. Intraepithelial airway dendritic cells: a distinct subset of pulmonary dendritic cells obtained by microdissection. *J Exp Med* 1992;175(3):797-807.
257. Suda T, McCarthy K, Vu Q, McCormack J, Schneeberger EE. Dendritic cell precursors are enriched in the vascular compartment of the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;19(5):728-37.
258. Masten BJ, Lipscomb MF. Comparison of lung dendritic cells and B cells in stimulating naive antigen-specific T cells. *J Immunol* 1999;162(3):1310-7.
259. Stumbles PA, Thomas JA, Pimm CL, Lee PT, Venaille TJ, Proksch S, et al. Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. *J Exp Med* 1998;188(11):2019-31.
260. Korppi M, Kuikka L, Reijonen T, Remes K, Juntunen-Backman K, Launiala K. Bronchial asthma and hyperreactivity after early childhood bronchiolitis or pneumonia. An 8-year follow-up study. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1994;148(10):1079-84.

261. Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B, Bjorksten B. Asthma and immunoglobulin E antibodies after respiratory syncytial virus bronchiolitis: a prospective cohort study with matched controls. *Pediatrics* 1995;95(4):500-5.
262. Bellini A, Vittori E, Marini M, Ackerman V, Mattoli S. Intraepithelial dendritic cells and selective activation of Th2-like lymphocytes in patients with atopic asthma. *Chest* 1993;103(4):997-1005.
263. Moller GM, Overbeek SE, Van Helden-Meeuwsen CG, Van Haarst JM, Prens EP, Mulder PG, et al. Increased numbers of dendritic cells in the bronchial mucosa of atopic asthmatic patients: downregulation by inhaled corticosteroids. *Clin Exp Allergy* 1996;26(5):517-24.
264. Serafini B, Columba-Cabezas S, Di Rosa F, Aloisi F. Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol* 2000;157(6):1991-2002.
265. Suter T, Malipiero U, Otten L, Ludewig B, Muelethaler-Mottet A, Mach B, et al. Dendritic cells and differential usage of the MHC class II transactivator promoters in the central nervous system in experimental autoimmune encephalitis. *Eur J Immunol* 2000;30(3):794-802.
266. Link H, Huang YM, Masterman T, Xiao BG. Vaccination with autologous dendritic cells: from experimental autoimmune encephalomyelitis to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2001;114(1-2):1-7.
267. Huang YM, Yang JS, Xu LY, Link H, Xiao BG. Autoantigen-pulsed dendritic cells induce tolerance to experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in Lewis rats. *Clin Exp Immunol* 2000;122(3):437-44.
268. Yang JS, Xu LY, Huang YM, Van Der Meide PH, Link H, Xiao BG. Adherent dendritic cells expressing high levels of interleukin-10 and low levels of interleukin-12 induce antigen-specific tolerance to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunology* 2000;101(3):397-403.
269. Glick B, Chang T.S. and Jaap, R.G. The bursa of Fabricius and antibody production on the domestic fowl. *Poult Sci* 1956(35):224ff.
270. Avery S, Rothwell L, Degen WD, Schijns VE, Young J, Kaufman J, et al. Characterization of the first nonmammalian T2 cytokine gene cluster: the cluster contains functional single-copy genes for IL-3, IL-4, IL-13, and GM-CSF, a gene for IL-5 that appears to be a pseudogene, and a gene encoding another cytokinelike transcript, KK34. *J Interferon Cytokine Res* 2004;24(10):600-10.

271. Carrillo-Farga J, Castell A, Perez A, Rondan A. Langerhans-like cells in amphibian epidermis. *J Anat* 1990;172:39-45.
272. Carrillo-Farga J, Perez Torres A, Castell Rodriguez A, Antuna Bizarro S. Adenosine triphosphatase-positive Langerhans-like cells in the epidermis of the chicken (*Gallus gallus*). *J Anat* 1991;176:1-8.
273. Akhter N, Kobayashi M, Hoshino T. Avian epidermis contains ATPase- and Ia-positive Langerhans-like cells. *Cell Tissue Res* 1993;271(1):103-6.
274. Perez Torres A, Millan Aldaco DA. Ia antigens are expressed on ATPase-positive dendritic cells in chicken epidermis. *J Anat* 1994;184 (Pt 3):591-6.
275. Castell-Rodriguez AE, Hernandez-Penaloza A, Sampedro-Carrillo EA, Herrera-Enriquez MA, Alvarez-Perez SJ, Rondan-Zarate A. ATPase and MHC class II molecules co-expression in *Rana pipiens* dendritic cells. *Dev Comp Immunol* 1999;23(6):473-85.
276. Perez-Torres A, Millan-Aldaco DA, Rondan-Zarate A. Epidermal Langerhans cells in the terrestrial turtle, *Kinosternum integrum*. *Dev Comp Immunol* 1995;19(3):225-36.
277. Perez-Torres A, Ustarroz-Cano M. Demonstration of birbeck (Langerhans cells) granules in the normal chicken epidermis. *J Anat* 2001;199(Pt 4):493-7.
278. Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 1965;19(6):739-44.
279. Linser PJ. Multiple marker analysis in the avian optic tectum reveals three classes of neuroglia and carbonic anhydrase-containing neurons. *J Neurosci* 1985;5(9):2388-96.
280. Cocchia D, Michetti F, Donato R. Immunochemical and immuno-cytochemical localization of S-100 antigen in normal human skin. *Nature* 1981;294(5836):85-7.
281. Takahashi K, Yamaguchi H, Ishizeki J, Nakajima T, Nakazato Y. Immunohistochemical and immunoelectron microscopic localization of S-100 protein in the interdigitating reticulum cells of the human lymph node. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1981;37(2):125-35.
282. Ide F, Iwase T, Saito I, Umemura S, Nakajima T. Immunohistochemical and ultrastructural analysis of the proliferating cells in histiocytosis X. *Cancer* 1984;53(4):917-21.
283. Cocchia D, Tiberio G, Santarelli R, Michetti F. S-100 protein in "follicular dendritic" cells or rat lymphoid organs. An immunochemical and immunocytochemical study. *Cell Tissue Res* 1983;230(1):95-103.

284. Carbone A, Manconi R, Poletti A, Volpe R, Santi L. S-100 protein immunostaining in cells of dendritic morphology within reactive germinal centers by ABC immunoperoxidase method. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1985;406(1):27-32.
285. Gallego M, del Cacho E, Arnal C, Felices C, Lloret E, Bascuas JA. Immunocytochemical detection of dendritic cell by S-100 protein in the chicken. *Eur J Histochem* 1992;36(2):205-13.
286. Olah I, Glick B, McCorkle F, Stinson R. Light and electron microscope structure of secretory cells in the medulla of bursal follicles of normal and cyclophosphamide treated chickens. *Dev Comp Immunol* 1979;3(1):101-15.
287. Olah I, Glick B. Structure of the germinal centers in the chicken caecal tonsil: light and electron microscopic and autoradiographic studies. *Poult Sci* 1979;58(1):195-210.
288. Glick BaOI. A continuum of cells leading to an in vivo humoral response. *Immunology Today* 1984;5:162-165.
289. Zapata ELCaAG. The immune system: comparative histophysiology. Ltd England: John Wiley and Sons; 1990.
290. Jeurissen SH, Claassen E, Janse EM. Histological and functional differentiation of non-lymphoid cells in the chicken spleen. *Immunology* 1992;77(1):75-80.
291. Jeurissen SH. The role of various compartments in the chicken spleen during an antigen-specific humoral response. *Immunology* 1993;80(1):29-33.
292. Mast J, Goddeeris BM, Peeters K, Vandesande F, Berghman LR. Characterisation of chicken monocytes, macrophages and interdigitating cells by the monoclonal antibody KUL01. *Vet Immunol Immunopathol* 1998;61(2-4):343-57.
293. Kaufman J, Skjoedt K, Salomonsen J, Simonsen M, Du Pasquier L, Parisot R, et al. MHC-like molecules in some nonmammalian vertebrates can be detected by some cross-reactive xenoantisera. *J Immunol* 1990;144(6):2258-72.
294. Jeurissen SH, Janse EM, Koch G, de Boer GF. The monoclonal antibody CVI-ChNL-68.1 recognizes cells of the monocyte-macrophage lineage in chickens. *Dev Comp Immunol* 1988;12(4):855-64.
295. Sowder JT, Chen CL, Ager LL, Chan MM, Cooper MD. A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor. *J Exp Med* 1988;167(2):315-22.

296. Cihak J, Ziegler-Heitbrock HW, Trainer H, Schraner I, Merckenschlager M, Losch U. Characterization and functional properties of a novel monoclonal antibody which identifies a T cell receptor in chickens. *Eur J Immunol* 1988;18(4):533-7.
297. Zengerling G. *Entwicklung und Struktur des Immunsystems der Hühnerlunge*; 2006.
298. Matoltsy AG. Keratinization of the avian epidermis: an ultrastructural study of the newborn chick skin. *J Ultrastruct Res* 1969;29(5):438-58.
299. Jenkinson DM, Blackburn PS. The distribution of nerves, monoamine oxidase and cholinesterase in the skin of poultry. *Res Vet Sci* 1968;9(5):429-34.
300. Ostmann OW, Ringer, R.K. and Tetzlaff, M. The anatomy of the feather follicle and its immediate surroundings. *Poult Sci* 1963;42:958-969.
301. Hodges RD, editor. *The Histology of the Fowl*. London, New York, San Francisco: Academic Press Inc; 1974.
302. Meyer W, Rohrs M. [From the reptilian scale to feathers and hair--evolution of skin appendages]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1986;93(6):245-51.
303. Sawyer RH, Abbott UK. Defective histogenesis and morphogenesis in the anterior shank skin of the scaleless mutant. *J Exp Zool* 1972;181(1):99-110.
304. Deeg CA. *Entwicklung monoklonaler Antikörper zur Charakterisierung aviärer Makrophagen*; 1997.
305. Obranovich TD, Boyd RL. A bursal stromal derived cytokine induces proliferation of MHC class II bearing cells. *Dev Comp Immunol* 1996;20(1):61-75.
306. Glick B. The ontogeny and microenvironment of the avian thymus and bursa of Fabricius: contribution of specialized cells to the avian immune response. *Adv Vet Sci Comp Med* 1985;30:67-90.
307. Duncker HR. [Bronchial tree of the bird lung]. *Verh Anat Ges* 1967;62:287-92.
308. Duncker HR. Vertebrate lungs: structure, topography and mechanics. A comparative perspective of the progressive integration of respiratory system, locomotor apparatus and ontogenetic development. *Respir Physiol Neurobiol* 2004;144(2-3):111-24.
309. Duncker HR. [Lung structure of birds and their air bags]. *Verh Anat Ges* 1967;62:597-8.
310. Duncker HR. [Structural types of parabronchi of avian lungs]. *Verh Anat Ges* 1969;63:297-301.
311. König HE, Reese, S. und Mülling, C. *Allgemeine Körperdecke (Integumentum commune)*. In: König HEuL, H.-G., editor. *Anatomie und Propädeutik des Geflügels*. Stuttgart, New York: Schattauer; 2001. p. 221-232.

312. Künzel E. Haut (Integumentum commune). In: Mosimann WuK, T., editor. *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere*. Berlin und Hamburg: Parey-Verlag; 1990. p. 259-287.
313. Salomon F-V. *Lehrbuch der Geflügelanatomie*. Jena, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1993.
314. Valladeau J, Saeland S. Cutaneous dendritic cells. *Semin Immunol* 2005;17(4):273-83.
315. Bergstresser PR, Tigelaar RE, Dees JH, Streilein JW. Thy-1 antigen-bearing dendritic cells populate murine epidermis. *J Invest Dermatol* 1983;81(3):286-8.
316. Tschachler E, Schuler G, Hutterer J, Leibl H, Wolff K, Stingl G. Expression of Thy-1 antigen by murine epidermal cells. *J Invest Dermatol* 1983;81(3):282-5.
317. Dezutter-Dambuyant C, Cordier G, Schmitt D, Faure M, Laquoi C, Thivolet J. Quantitative evaluation of two distinct cell populations expressing HLA-DR antigens in normal human epidermis. *Br J Dermatol* 1984;111(1):1-11.
318. Romani N, Stingl G, Tschachler E, Witmer MD, Steinman RM, Shevach EM, et al. The Thy-1-bearing cell of murine epidermis. A distinctive leukocyte perhaps related to natural killer cells. *J Exp Med* 1985;161(6):1368-83.
319. Glick B. How it all began: the continuing story of the Bursa of fabricious. In: Toivanen P, editor. *Avian Immunology: Basis and Practice*. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.; 1987.
320. Miller JF, Mitchell GF. Cell to cell interaction in the immune response. I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. *J Exp Med* 1968;128(4):801-20.
321. Mitchell GF, Miller JF. Cell to cell interaction in the immune response. II. The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes. *J Exp Med* 1968;128(4):821-37.
322. Langman RE, Cohn M. A theory of the ontogeny of the chicken humoral immune system: the consequences of diversification by gene hyperconversion and its extension to rabbit. *Res Immunol* 1993;144(6-7):422-46.
323. Reynaud CA, Bertocci B, Dahan A, Weill JC. Formation of the chicken B-cell repertoire: ontogenesis, regulation of Ig gene rearrangement, and diversification by gene conversion. *Adv Immunol* 1994;57:353-78.
324. Jeurissen SH. Structure and Function of Lymphoid Tissues of the Chicken. *Poultry Science Rev* 1994:183-207.

325. Budras K-DuK, H.E. Immunsystem und lymphatische Organe. In: König HEuL, H.-G., editor. Anatomie und Propädeutik des Geflügels. Stuttgart, New York: Schattauer; 2001. p. 161-168.
326. Beezhold DH, Sachs HG, Van Alten PJ. The development of transport ability by embryonic follicle-associated epithelium. *J Reticuloendothel Soc* 1983;34(2):143-52.
327. Sorvari T, Sorvari R, Ruotsalainen P, Toivanen A, Toivanen P. Uptake of environmental antigens by the bursa of Fabricius. *Nature* 1975;253(5488):217-9.
328. Olah I, Glick B. The number and size of the follicular epithelium (FE) and follicles in the bursa of Fabricius. *Poult Sci* 1978;57(5):1445-50.
329. Sorvari R, Sorvari TE. Bursa Fabricii as a peripheral lymphoid organ. Transport of various materials from the anal lips to the bursal lymphoid follicles with reference to its immunological importance. *Immunology* 1977;32(4):499-505.
330. Ekino S, Matsuno K, Kotani M. Distribution and role of lymph vessels of the bursa Fabricii. *Lymphology* 1979;12(4):247-52.
331. Lassila O. Emigration of B cells from chicken bursa of Fabricius. *Eur J Immunol* 1989;19(5):955-8.
332. Houssaint E, Mansikka A, Vainio O. Early separation of B and T lymphocyte precursors in chick embryo. *J Exp Med* 1991;174(2):397-406.
333. Van Furth R. Monocytes. In: Roitt IM, Delves, P.J., editor. *Encyclopedia of Immunology*. London: Academic Press; 1992. p. 1092-1097.
334. Jeurissen SH, Janse EM. Germinal centers develop at predilected sites in the chicken spleen. *Adv Exp Med Biol* 1994;355:237-41.
335. Hayter RB, Besch EL. Airborne-particle deposition in the respiratory tract of chickens. *Poult Sci* 1974;53(4):1507-11.
336. Jeurissen SH, Janse EM, Koch G, De Boer GF. Postnatal development of mucosa-associated lymphoid tissues in chickens. *Cell Tissue Res* 1989;258(1):119-24.
337. Sminia T, van der Brugge-Gamelkoorn GJ, Jeurissen SH. Structure and function of bronchus-associated lymphoid tissue (BALT). *Crit Rev Immunol* 1989;9(2):119-50.
338. Hayday A, Theodoridis E, Ramsburg E, Shires J. Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nat Immunol* 2001;2(11):997-1003.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. B. Kaspers für die Überlassung des Themas und die hervorragende fachliche Betreuung. Auch die stete Bereitschaft zur kritischen Diskussion war für mich von unschätzbarem Wert.

Bei Herrn Prof. Dr. M. Stangassinger bedanke ich mich für den am Institut zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Herrn Prof. Dr. Sven Reese danke ich für die enge wissenschaftliche Kooperation und die hervorragende fachliche Unterstützung.

Dr. Grammatia Zengerling und Silvia Mitterer danke ich für die ausgezeichnete Einarbeitung in die Methoden und die exzellente technische Unterstützung.

Den Mitarbeitern des Instituts für Tierphysiologie danke ich für das freundliche Arbeitsklima und ihre stete Hilfsbereitschaft.

Mein Dank gilt ebenso Dr. Sonja Kothlow sowie meinen Mitstreitern Iris Morgenroth und Jenny Dieckmann.

Für die Betreuung der Tiere danke ich Fritz Meggendorfer, Hedi Opitz und Thomas Hoschka.

Auch meiner Familie und meinem Mann Tobias möchte ich an dieser Stelle herzlich für ihre Unterstützung und ihr Verständnis danken.