

Phänotypische und funktionelle Untersuchung der Expression und
Funktion des Mannoserezeptors auf Langerhans-Zellen und auf
Inflammatorischen Dendritischen Epidermalen Zellen (IDEC) sowie auf
Monozyten und auf in vitro generierten dendritischen Zellen

Eva-Maria Schottdorf

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. Gerd Plewig

Phänotypische und funktionelle Untersuchung der Expression und Funktion des
Mannoserezeptors auf Langerhans-Zellen und auf Inflammatorischen Dendritischen
Epidermalen Zellen (IDEC) sowie auf Monozyten und auf in vitro generierten
dendritischen Zellen

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

vorgelegt von
Eva-Maria Schottdorf
aus
München
2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. med. A. Wollenberg
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. E. Standl Prof. Dr. med. H.-G. Klobeck
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	10.10.2002

1	EINLEITUNG	1
1.1	ENTZÜNDLICHE HAUT.....	1
1.2	DENDRITISCHE ZELLEN IN DER HAUT.....	2
1.2.1	LANGERHANS-ZELLEN	3
1.2.1.1	Vorkommen und Ultrastruktur der Langerhans-Zellen	3
1.2.1.2	Phänotyp der Langerhans-Zellen	3
1.2.1.3	Funktion der Langerhans-Zellen.....	4
1.2.2	INFLAMMATORISCHE DENDRITISCHE EPIDERMAL ZELLEN, IDEC	5
1.2.2.1	Abgrenzung der IDEC von den Langerhans-Zellen mittels Phänotypisierung	5
1.2.2.2	Vorkommen der IDEC.....	6
1.3	ENDOZYTOSE	6
1.3.1	PINOZYTOSE	6
1.3.2	REZEPTOR-VERMITTELTE ENDOZYTOSE	7
1.3.3	PHAGOZYTOSE.....	8
1.4	DER MANNOSEREZEPTOR	9
1.4.1	BAU DES MANNOSEREZEPTORS UND VERWANDTE STRUKTUREN	9
1.4.2	VORKOMMEN DES MANNOSEREZEPTORS.....	10
1.4.3	FUNKTION DES MANNOSEREZEPTORS.....	10
1.5	FRAGESTELLUNG	13
2	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	GEWINNUNG DER BIOPSIE AUS ENTZÜNDETER HAUT.....	15
2.2	IMMUNFÄRBUNG VON HAUTSCHNITTEN MIT DER APAAP-TECHNIK	15
2.2.1	HERSTELLUNG DER HAUTSCHNITTE AM KRYOMIKROTOM.....	15
2.2.2	FÄRBUNG DER HAUTSCHNITTE IN DER APAAP-TECHNIK.....	15
2.3	GEWINNUNG VON MONOZYTEN AUS PERIPHEREM BLUT	16
2.3.1	GEWINNUNG VON MONOZYTEN UNTER VERWENDUNG VON DEXTRAN UND NYCOPREP.....	17
2.3.2	GEWINNUNG VON MONOZYTEN UNTER VERWENDUNG VON FICOLL	17
2.4	GEWINNUNG VON MONOZYTÄREN DENDRITISCHEN ZELLEN AUS MONOZYTEN	18
2.5	PRÄPARATION DER EINZELZELLSUSPENSION AUS SPALTHAUT UND ENTZÜNDLICHER HAUT	18
2.6	PHÄNOTYPISIERUNG	19
2.6.1	FÄRBUNG DER ZELLEN	19
2.6.2	ANALYSE DER ZELLEN AM DURCHFLUßZYTOMETER.....	20
2.6.3	AUSWERTUNG	21
2.6.4	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	22
2.7	ENDOZYTOSE	22
2.7.1	PINOZYTOSE	22
2.7.2	REZEPTOR-VERMITTELTE ENDOZYTOSE	23
2.7.3	HEMMUNG DER REZEPTOR-VERMITTELTEN ENDOZYTOSE	23
2.7.4	PHAGOZYTOSE.....	24
2.7.5	ANALYSE DER FUNKTIONELLEN ENDOZYTOSE-VERSUCHE AM DURCHFLUßZYTOMETER	24

3	ERGEBNISSE	26
3.1	IMMUNPHÄNOTYP DER ZELLEN	26
3.1.1	IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG VON HAUTSCHNITTEN MIT DER APAAP-TECHNIK.....	26
3.1.1.1	Der Mannoserezeptor wird in der normalen Epidermis nicht exprimiert.....	26
3.1.1.2	Dendritische Zellen in entzündlicher Haut exprimieren den Mannoserezeptor.....	26
3.1.2	DURCHFLUßZYTOMETRISCHE FÄRBUNGEN.....	29
3.1.2.1	Phänotypischer Nachweis des Mannoserezeptors nur auf monozytären dendritischen Zellen, nicht auf Monozyten	29
3.1.2.2	Die dendritischen Zellen in der normalen Haut exprimieren den Mannoserezeptor nicht.....	30
3.1.2.3	In der entzündeten Haut exprimieren die IDEC den Mannoserezeptor.....	31
3.1.2.4	Unterschiedlich starke Expression des Mannoserezeptors auf den IDEC bei verschiedenen Hauterkrankungen.....	32
3.2	FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR ENDOZYTÖSE.....	33
3.2.1	FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNGEN AN MONOZYTEN UND MONOZYTÄREN DENDRITISCHEN ZELLEN	33
3.2.1.1	Pinozytose-Nachweis an Monozyten und monozytären dendritischen Zellen mit Lucifer Yellow.....	33
3.2.1.2	Monozytäre dendritische Zellen nehmen über den Mannoserezeptor Dextran auf, Monozyten nicht	37
3.2.1.3	Der Mannoserezeptor ist nur auf den monozytären dendritischen Zellen hemmbar, Monozyten besitzen ihn nicht.....	38
3.2.1.4	Monozyten phagozytieren E.coli, monozytäre dendritische Zellen nicht.....	42
3.2.2	FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNGEN AN LANGERHANS-ZELLEN UND IDEC.....	44
3.2.2.1	Dendritische Hautzellen nehmen Lucifer Yellow über Pinozytose auf.....	44
3.2.2.2	Nur IDEC besitzen die Fähigkeit zu Rezeptor-vermittelter Endozytose.....	50
3.2.2.3	Der Mannoserezeptor kann auf den IDEC durch Mannan gehemmt werden.....	51
3.2.2.4	Dendritische Zellen der Haut können keine E.coli phagozytieren	59

4	DISKUSSION	62
4.1	VORKOMMEN UND FUNKTION DES MANNOSEREZEPTORS.....	62
4.2	MONOZYTEN EXPRIMIEREN DEN MANNOSEREZEPTOR NICHT	63
4.3	DER MANNOSEREZEPTOR FUNGIERT ALS ERKENNUNGSMERKMAL DER MoDC'S UND MEDIATOR EINER EFFIZIENTEN ENDOZYTULOSE	64
4.4	LANGERHANS-ZELLEN SIND DENDRITISCHE ZELLEN OHNE MANNOSEREZEPTOR	66
4.5	FUNKTION DER LANGERHANS-ZELLEN.....	67
4.6	LC ZEIGEN DEUTLICHE UNTERSCHIEDE ZU DEN ÜBRIGEN ANTIGEN-PRÄSENTIERENDEN ZELLEN	68
4.7	IDEC TRAGEN ALS DENDRITISCHE ZELLEN DER HAUT DEN MANNOSEREZEPTOR.....	69
4.8	DER MANNOSEREZEPTOR IM ZUSAMMENHANG MIT DER FUNKTION DER IDEC.....	70
4.9	UNTERSCHIEDE IN DER EXPRESSION DES MANNOSEREZEPTORS AUF DEN IDEC BEI VERSCHIEDENEN HAUTERKRANKUNGEN.....	71
4.10	URSPRUNG UND VERWANDTSCHAFT DER IDEC.....	71
4.11	MONOZYTEN PHAGOZYTIEREN E.COLI OHNE DEN MANNOSEREZEPTOR ZU EXPRIMIEREN	73
4.12	MoDC'S ZEIGEN KEINE PHAGOZYTULOSE TROTZ DER EXPRESSION DES MANNOSEREZEPTORS AUF DER ZELLOBERFLÄCHE	74
4.13	LANGERHANS-ZELLEN SIND AUSSCHLIEßLICH ZUR PINOZYTULOSE FÄHIG	74
4.14	IDEC PHAGOCYTIEREN KEINE E.COLI, OBWOHL SIE DEN MANNOSEREZEPTOR TRAGEN	74
4.15	AUSBLICK.....	75
5	ZUSAMMENFASSUNG	77
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	79
7	ANHANG.....	90
7.1	REZEPTE FÜR REAGENTIEN	90
7.1.1	REAGENTIEN FÜR DIE APAAP-FÄRBUNG	90
7.1.2	PUFFER UND LÖSUNGEN FÜR DIE PHÄNOTYPISIERUNG UND DIE ENDOZYTULOSE.....	92
7.1.3	ANTIKÖRPER UND STOFFE FÜR DIE PHÄNOTYPISIERUNG, DIE PINOZYTULOSE UND DIE REZEPTOR-VERMITTELTE ENDOZYTULOSE.....	96
7.2	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	100
8	DANKSAGUNG.....	101
9	LEBENS LAUF.....	102

1 Einleitung

1.1 Entzündliche Haut

In der entzündlichen Haut verteilen sich die schon in der gesunden Haut vorhandenen Zellen neu, es treten weitere Zellen hinzu, andere Rezeptoren werden auf den Zelloberflächen exprimiert und zudem bestimmte Zytokine sezerniert. Langerhans-Zellen bilden in der gesunden Haut in der Epidermis ein Netzwerk, während sie in der Dermis kaum zu finden sind. Aktivierte Langerhans-Zellen, erkennbar an der Expression von B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) und CD83 gibt es in der normalen Haut nicht (Katou et al., 2000). CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten sind in der normalen Haut nur spärlich in der Dermis vorhanden (Katou et al., 2000). In der entzündeten Haut reduziert sich bei einigen Erkrankungen die Zahl der CD1a-positiven dendritischen Zellen in der Epidermis der entzündeten Haut um die Hälfte, während sie in der Dermis stark ansteigt. Hier finden sich die dendritischen Zellen, welche durch Bestimmung ihrer Oberflächenrezeptoren (CD86⁺, CD83⁺, CD1a⁺, LAG⁺) als aktivierte Langerhans-Zellen identifiziert wurden, in den Nestern der T-Lymphozyten, welche sie mit ihren zytoplasmatischen Zellausläufern umfassen. Die aktivierten Langerhans-Zellen ließen sich auch in den Lymphgefäßen der Haut darstellen (Katou et al., 2000). Bei den T-Lymphozyten handelt es sich vornehmlich um CD4-positiv T-Helfer-Zellen, CD8-positiv T-Lymphozyten treten nur vereinzelt auf. CD4-positiv T-Zellen schütten bei Auftreten einer Entzündung bestimmte Zytokine aus, dabei gibt es zwei Gruppen von T-Zellen, welche unterschiedliche Zytokine sezernieren. Die TH-1 Zellen produzieren IL-2 und IFN γ , die TH-2 Zellen IL-4 und IL-5 (Hu-Li et al., 1987). Die Zytokine beeinflussen die Zellen in ihrer Aktivität und somit das Mikromilieu. Auch Makrophagen werden durch die Zytokine in ihrer Aktivität bei der Phagozytose und Eliminierung von Mikroorganismen beeinflusst und nehmen ihrerseits Einfluß auf die Aktivität der T-Lymphozyten (Gordon, 1998). IL-4 reguliert die Expression des niedrigaffinen IgE-Rezeptors CD23 herauf (Vercelli et al., 1989), IL-5 fördert die Differenzierung der eosinophilen Granulozyten und verlängert ihr Überleben (Lopez et al., 1992). IFN γ spielt eine entscheidende Rolle bei der auch zytotoxischen Abwehr pathogener Mikroorganismen und es inhibiert die IL-4-abhängige IgE-Produktion (Pène et al. 1988). Beim atopischen Ekzem liegt eine Dysregulation der Zytokinproduktion vor.

So wird während der akuten Entzündung vermehrt IL-4 und IL-5 und weniger IFN γ sezerniert, während der chronischen neben IL-5 hauptsächlich IFN γ (Hamid et al., 1994). Die Läsionen bei akutem und chronischem atopischem Ekzem unterscheiden sich auch in ihrem jeweiligen makroskopischen Aspekt, dem zellulären Infiltrat und der Interzellulärsubstanz (Mihm et al., 1976). Das akute atopische Ekzem zeichnet sich durch ein interzelluläres Ödem, wenige Lymphozyten in der Epidermis, Lymphozyten um die Gefäße in der Dermis sowie einige Monozyten und Makrophagen aus. Wenige eosinophile und neutrophile Granulozyten sind vorhanden. Damit verbunden sind Exkorationen, Erosionen und erythematöse Papeln. In den chronischen Hautläsionen dominieren die Makrophagen, es finden sich vermehrt aktivierte Langerhans-Zellen und Mastzellen. Die Epidermis ist durch Lichenifikation und Hyperkeratose gezeichnet, die oberen Schichten der Dermis sind fibrosiert, ein Effekt, der unter anderem auf ständiges Kratzen zurückzuführen ist.

1.2 Dendritische Zellen in der Haut

Dendritische Zellen gehören zu den wirksamsten antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems. Sie zeichnen sich dadurch aus, daß sie nicht nur wie beispielsweise die B-Lymphozyten eine sekundäre Immunantwort auslösen, sondern auch naive T-Lymphozyten im Sinne einer primären Immunantwort prägen können (Steinmann, 1991). Vom Knochenmark ausgehend gelangen sie in die Blutbahn und weiter in die verschiedenen Gewebe des Körpers, wo sie als unreife Zellen bis zur Aufnahme eines Antigens verweilen. Sie prozessieren das aufgenommene Antigen, wandern zu den T-Zell-Arealen der sekundären lymphatischen Organe und präsentieren es auf MHC Klasse II Rezeptoren den T-Zellen. Dabei durchlaufen die dendritischen Zellen eine Reifung. Sie verlieren ihre Fähigkeit zur Antigen-Aufnahme und Prozessierung und werden zu antigenpräsentierenden immunstimulierenden Zellen, welche primäre oder sekundäre Immunantworten hervorrufen. Langerhans-Zellen sind die am besten untersuchten dendritischen Zellen der Haut. Eine weitere Population dendritischer Zellen, die inflammatorischen dendritischen epidermalen Zellen, IDEC, konnten in der entzündlichen Haut mittels durchflußzytometrischer und elektronenmikroskopischer Untersuchungen von den Langerhans-Zellen abgegrenzt werden (Wollenberg et al., 1996). Ferner finden sich in der Dermis dendritische Zellen, welche sich durch die Expression des Faktors XIIIa auf ihrer Oberfläche auszeichnen

(Cerio et al., 1989, Nestle et al., 1993, Nestle et al., 1998) und dermale Dendrozyten genannt werden. In ihrer Fähigkeit, Antigene zu präsentieren, sollen sie den Langerhans-Zellen in vitro gleichkommen (Nestle et al., 1998) zudem scheinen sie an der Pathogenese der Psoriasis beteiligt zu sein (Nestle et al., 1994).

1.2.1 Langerhans-Zellen

1.2.1.1 Vorkommen und Ultrastruktur der Langerhans-Zellen

Benannt wurden diese Zellen nach Paul Langerhans, der sie im Jahre 1868 durch eine Goldchlorid-Färbung entdeckte und zunächst für feine Hautnerven hielt (Langerhans, 1868). Als Vertreter der dendritischen Zellen in der Haut entstammen die Langerhans-Zellen wie alle dendritische Zellen dem Knochenmark. Sie liegen in den suprabasalen Schichten der Epidermis und den oberen Schichten der Dermis und bilden dort mit ihren charakteristischen dendritischen Zellausläufern ein Netzwerk, welches der Antigen-Aufnahme dient. Die Zellen sind am gesamten Körper regelmäßig verteilt ($450/\text{mm}^2$), lediglich die Handflächen und Fußsohlen bilden mit 60 Zellen pro mm^2 eine Ausnahme (Berman et al., 1983). Langerhans-Zellen machen in normaler, nicht entzündeter Haut ein bis zwei Prozent aus. So kommt etwa eine Langerhans-Zelle auf 80 Keratinozyten. Die Zellen zeigen ein helles Zytoplasma und einen gelappten Nucleus, jedoch keine Desmosomen, Melanosomen, Tonofilamente oder Merkel Zell Granula (Birbeck et al. 1961, Wolff, 1972). Die Langerhans-Zellen besitzen in ihrem Inneren die für sie typischen Birbeck-Granula, ihr sicherstes Erkennungsmerkmal. Diese Granula können durch Anfärben der Zellen mit dem für die Granula spezifischen monoklonalen Antikörper LAG nachgewiesen werden (Wollenberg et al., 1996). Die Birbeck-Granula wurden 1961 erstmals beschrieben (Birbeck et al.). Sie haben eine tennisschlägerartige Form und einen trilammellären Stiel. Es wurde angenommen, daß sie in der Endozytose von Antigenen eine Rolle spielen (Schuler et al., 1983, Takigawa et al., 1985, Bartosik 1992). Während der Reifung der Langerhans-Zellen gehen die Birbeck-Granula verloren (Schuler und Steinman, 1985).

1.2.1.2 Phänotyp der Langerhans-Zellen

Durch Immunphänotypisierung, also durch Darstellung von Oberflächen-Antigenen durch spezifische Antikörper und daran gebundene Farbstoffe, konnten auf

Langerhans-Zellen bislang eine Reihe von Oberflächen-Rezeptoren und Zellmembran-Antigenen charakterisiert werden. So exprimieren die Langerhans-Zellen das nicht klassische MHC Molekül CD1a. CD1 Moleküle könnten bei der Präsentation von Glycolipiden eine Rolle spielen. CD1a wird auf Langerhans-Zellen stark exprimiert, auf den übrigen epidermalen und dermalen Zellen der normalen Haut ist es nicht zu finden und stellt somit einen geeigneten Marker dar (Fithian et al., 1983). CD1b läßt sich nicht auf der Oberfläche der Langerhans-Zellen darstellen (Wollenberg et al., 1999), ebenso sind sie negativ für CD11b. Den entzündungsspezifischen Thrombospondin-Rezeptor CD36, bekannt als Merkmal von Zellen, die nicht den Keratinozyten oder den Langerhans-Zellen zuzuordnen sind, exprimieren sie ausschließlich in entzündlichen Hautläsionen in geringem Maße (Wollenberg et al., 1999). Als Immunglobulin-Rezeptoren konnten auf den Langerhans-Zellen der IgG-Rezeptor Fc γ RII/CD32 (Schmitt et al. 1990, Stingl et al., 1977), ein Rezeptor mit niedriger Affinität zum zugehörigen Immunglobulin und die IgE-Rezeptoren Fc ϵ RII/CD23 (Bieber et al., 1989a) mit niedriger Antigen-Affinität sowie der hochaffine Rezeptor Fc ϵ RI (Bieber et al., 1992a, Grabbe et al., 1993, Wang et al., 1992) gefunden werden. Der hochaffine IgE-Rezeptor Fc ϵ RI findet sich in normaler Haut in nur kleinen Mengen, seine Expression steigt in entzündlicher Haut, insbesondere beim atopischen Ekzem an. Zuletzt wurde das IgE-bindende Protein eBP (Wollenberg et al., 1993) entdeckt, aufgrund seiner nicht membranständigen Zellbindung nimmt es eine Sonderstellung ein.

1.2.1.3 Funktion der Langerhans-Zellen

Langerhans-Zellen werden als unreife dendritische Zellen der Haut betrachtet, die durch Pinozytose Antigene aufnehmen können. Nach der Antigenaufnahme wandern die Langerhans-Zellen aus der Epidermis durch die Lymphgefäße zum Lymphknoten. Währenddessen werden die Antigene prozessiert, um im Lymphknoten den T-Zellen präsentiert werden zu können. Die Migration der Langerhans-Zellen konnte im Experiment nachvollzogen werden (Kraal et al., 1993, van Wilsen et al., 1994). Während dieses Prozesses reifen die Langerhans-Zellen, um sich von einer gut antigenaufnehmenden und prozessierenden, aber schlecht antigenpräsentierenden Zelle zur gut antigenpräsentierenden, aber schlecht antigenaufnehmenden und prozessierenden Zelle zu wandeln (Romani et al., 1989). Die Langerhans-Zellen

ändern dabei ihren Phänotyp, so werden die Oberflächen-Rezeptoren CD1a und CD32 vermindert exprimiert, während die MHC Klasse I und II Moleküle vermehrt auf der Zelloberfläche erscheinen (Bieber et al., 1992). Die Langerhans-Zellen sind in die Infekt- und Tumorabwehr involviert und sie können eine primäre (Steinman 1991) und sekundäre Immunantwort hervorrufen. Im Besonderen scheinen die Langerhans-Zellen bei der Pathogenese einiger Erkrankungen eine wichtige Rolle zu spielen, so beim allergischen Kontaktekzem (Silberberg et al. 1989, Toews et al., 1980), bei der Psoriasis vulgaris (Bieber et al., 1989, Bos et al., 1983, Demidem et al., 1991), bei der Mycosis fungoides (McMillan et al., 1982, MacKie 1981) und beim atopischen Ekzem (Bruynzeel-Koomen et al., 1986, Taylor et al., 1991, Bieber 1992).

1.2.2 Inflammatorische Dendritische Epidermale Zellen, IDEC

1.2.2.1 Abgrenzung der IDEC von den Langerhans-Zellen mittels Phänotypisierung

Die Inflammatorischen Dendritischen Epidermalen Zellen, IDEC, konnten mittels Durchflußzytometrie als eigene Zellpopulation in entzündlichen Hautläsionen von den Langerhans-Zellen abgegrenzt werden (Wollenberg et al., 1996). Dabei wurden bestimmte Oberflächen-Antigene durch die jeweiligen spezifischen Antikörper angefärbt und die Expression der Rezeptoren mit denen der Langerhans-Zellen verglichen. So exprimieren die IDEC an ihrer Zelloberfläche in geringerem Maße als die Langerhans-Zellen CD1a, wodurch sie in der Durchflußzytometrie gut von den Langerhans-Zellen abgegrenzt werden können (Wollenberg et al., 1999). CD1a ist ein Oberflächen-Rezeptor, der bislang in der Haut nur bei den Langerhans-Zellen gefunden wurde. Die IDEC zeigen ebenso CD1b, wobei die CD1b-Expression mit der des CD1a korreliert. HLA-DR und eine starke Ausprägung des CD11b, welches auf den Langerhans-Zellen nicht gefunden werden konnte, konnten beide auf den IDEC nachgewiesen werden. Der entzündungsspezifische Thrombospondin-Rezeptor CD36 konnte in großen Mengen auf der Zellmembran gefunden werden. Der hochaffine IgE-Rezeptor FcεRI wird stark exprimiert, insbesondere beim atopischen Ekzem, wobei die IDEC bei dieser Erkrankung die hauptsächlich für die IgE-Bindung zuständigen Zellen sind und nicht die Langerhans-Zellen (Wollenberg et al., 1999). Bei anderen Hauterkrankungen zeigten sich mittlere Expressionen des IgE-Rezeptors. Die IDEC zeigten keine Reaktion bei Anfärben der Zellen mit dem spezifischen

Antikörper LAG gegen die Birbeck-Granula (Wollenberg et al., 1996). Dies ist in Übereinstimmung mit den ultrastrukturellen Untersuchungen, in welchen eine Birbeck-Granula positive und eine Birbeck-Granula negative Population dendritischer Zellen in der Epidermis zur Darstellung kam. Sie zeigen ebenso wie die Langerhans-Zellen ein klares Zytoplasma ohne Melanosomen und Keratinfilamente.

1.2.2.2 Vorkommen der IDEC

Die IDEC sind in der entzündeten Haut regelmäßig nachweisbar, in der gesunden Haut kommen sie dagegen nicht vor. Liegt eine Hauterkrankung vor, so beschränkt sich das Vorkommen der IDEC auf die entzündeten Hautareale, die von der Erkrankung unbefallene Haut weist, wie auch die normale Haut, keine IDEC auf. In den entzündlichen Hautläsionen zeigen sie von Hautprobe zu Hautprobe unterschiedliches prozentuales Verhältnis zu den Langerhans-Zellen (Wollenberg et al., 1999).

1.3 Endozytose

Endozytose ist die Fähigkeit von Zellen, Stoffe aus ihrer Umgebung in sich aufzunehmen. Dafür stehen verschiedene Mechanismen zur Verfügung, es können lediglich Flüssigkeiten, größere Moleküle über bestimmte Rezeptoren, aber auch ganze Zelltrümmer oder Bakterien in eine Zelle einverleibt werden.

1.3.1 Pinozytose

Als Pinozytose wird die Aufnahme von Flüssigkeit und Partikeln in die Zelle durch Einstülpung der Zellmembran bezeichnet. Sie ist nicht von Rezeptoren abhängig und somit unspezifisch, alle Stoffe, die sich in einem Medium um eine Zelle herum befinden, werden ohne Präferenz in diese Zelle aufgenommen. Um die Pinozytose im Experiment nachzuweisen, werden deshalb Substanzen verwendet, die nicht an Rezeptoren binden, beispielsweise Lucifer Yellow, und somit nur über Pinozytose in die Zelle gelangen können. Alle Substrate, welche an Rezeptoren binden und auf diesem Weg in das Zellinnere gelangen, werden, da sie im umgebenden Medium gelöst sind, zusätzlich immer auch mittels Pinozytose aufgenommen. Die Pinozytose kann in Mikro- und Makropinozytose eingeteilt werden. Zur Mikropinozytose sind

alle Zellen befähigt. Hierbei entstehen kleine (0,1µm) von Clathrin umhüllte Vesikel (Watts und Marsh, 1992). Die Makropinozytose ist wenigen Zellen, wie Makrophagen und dendritischen Zellen, vorbehalten (Racoosin und Swanson, 1989/1992, West et al., 1989), wobei sie bei letzteren besonders ausgeprägt ist (Racoosin und Swanson, 1989, West et al., 1989). Dies gilt allerdings nur für die unreifen dendritischen Zellen in der Phase der Antigenaufnahme (Sallusto et al., 1995). Durch Actinfilamente des Zytoskelettes wird die Aufnahme größerer Vesikel (0,5-3µm) bei der Markopinozytose gesteuert. An MoDC's, unreifen dendritischen Zellen, welche aus Monozyten des Venenblutes durch Kultur gewonnen werden, konnte gezeigt werden, daß innerhalb einer Stunde Volumina, welche dem der Zelle selbst entsprechen, in die Zelle gelangen (Sallusto et al., 1995). Durch diese großen Mengen an Flüssigkeit wird erreicht, daß ausreichend viele Moleküle eines nicht an Rezeptoren bindenden Antigens in die Zelle aufgenommen werden. Die aufgenommenen Substanzen können im Zellinneren konzentriert und in Kompartimente, welche MHC Klasse II Moleküle, Cathepsin D und Lysosomen assoziiertes Membran Protein 1 (Lamp 1) enthalten, abgegeben werden. Beide Pinozytose-Mechanismen sind nicht sättigbar.

1.3.2 Rezeptor-vermittelte Endozytose

Im Gegensatz zur Pinozytose, bei welcher alle Substrate, die sich in der Umgebung der Zelle befinden, unselektiv in die Zelle aufgenommen werden, gelangen bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose, je nach Funktion der betreffenden Zelle, Moleküle und Partikel an bestimmte Rezeptoren gebunden in die Zelle. Dieser Mechanismus ist für die einzelnen Substrate effizienter als die Pinozytose, sie können leichter und schneller einverleibt und in der Zelle konzentriert werden. Die Rezeptor-vermittelte Endozytose wird durch für den jeweiligen Rezeptor spezifische Liganden nachgewiesen. Es muß jedoch beachtet werden, daß dieser spezifische Ligand auch durch Pinozytose in die Zelle aufgenommen wird, da die Pinozytose stets gleichzeitig mit der Rezeptor-vermittelten Endozytose stattfindet. Dieser Anteil der Pinozytose muß in Versuchen von der Rezeptor-vermittelten Endozytose abgegrenzt werden. Der Mannoserezeptor, der auf Makrophagen und unreifen dendritischen Zellen, die aus Blutmonozyten kultiviert wurden, nachgewiesen werden konnte (Tan et al., 1997, Mommaas et al., 1999, Sallusto et al., 1995), ist einer von vielen verschiedenen

Rezeptoren, die eine solche Endozytose vermitteln. An den Mannoserezeptor binden Antigene, die endständige Saccharide, wie Mannose, Fucose und N-Acetylglycosamine enthalten. Sie werden in kleinen clathrinumhüllten Vesikeln aufgenommen, während die Makropinozytose mit der Abschnürung größerer Vesikel einhergeht (Koning 1997). Durch die Rezeptor-vermittelte Endozytose können die Antigene in wesentlich größeren Mengen in die Zellen aufgenommen werden als dies durch die Pinozytose möglich wäre und dadurch, auch wenn nur geringe Konzentrationen von ihnen in der Umgebung der Zellen vorhanden sind, den T-Lymphozyten ausreichend für eine Immunantwort präsentiert werden. Der Mannoserezeptor erscheint allerdings nicht wie das aufgenommene Antigen im MHC Klasse II Kompartiment, sondern gibt seinen Liganden vermutlich bereits in einem früheren Kompartiment frei (Sallusto et al., 1995, Tan et al., 1997, Engering et al., 1997). Da sehr große Mengen der Antigene über den Mannoserezeptor aufgenommen werden können, welche die Anzahl der vorhandenen Rezeptor-Moleküle überschreiten, kann eine Wiederverwendung des Rezeptors angenommen werden (Sallusto et al., 1995, Tan et al., 1997).

1.3.3 Phagozytose

Die Fähigkeit beispielsweise der Makrophagen, Partikel in sich aufzunehmen (Metchnikoff 1884), ist der erste Schritt in einer Reihe von Ereignissen, die schließlich zur Elimination von zugrunde gegangenen Zellen, Zelltrümmern oder Bakterien führen. Sie kann nur von wenigen Zellen, vor allem den in den meisten Geweben vorkommenden Makrophagen bewerkstelligt werden und bedarf bestimmter Oberflächenrezeptoren wie Fc γ -Rezeptoren und Rezeptoren für Kohlenhydrate und Komplement-Faktoren sowie spezieller intrazellulärer Enzyme, wie unspezifischer Esterase, Lysozym und Peroxidase. Die Aufnahme der verschiedenen Substanzen wird durch die membranständigen Rezeptoren vermittelt. Lectinartige Rezeptoren erkennen Kohlenhydrate auf Bakterien (Gordon et al., 1988), Vitronectin (Savill et al., 1990) und andere Rezeptoren binden an die Oberfläche von apoptotischen Zellen, verschiedene Komplement-Rezeptoren binden direkt an Komplement-Faktoren auf der Oberfläche zahlreicher Mikroorganismen (Drevets und Campbell, 1991). Fc-Rezeptoren können die Phagozytose erheblich steigern (Kinet, 1989). Sie erkennen die Immunglobuline, mit welchen zum Beispiel Tumorzellen

oder Parasiten opsonisiert sind. Auf Makrophagen-Unterpopulationen finden sich verschiedene Fc-Rezeptoren und andere Rezeptoren, so daß nicht alle Makrophagen die gleichen Bakterien und Tumorzellen eliminieren können und das Spektrum der Abwehr vergrößert wird (Gordon et al., 1988, Leenen et al., 1993). Diese Unterschiede sind zum Teil durch äußere Einflüsse, wie Vorkommen von verschiedenen Zytokinen, welche die Dichte und Affinität der Oberflächenrezeptoren der Makrophagen beeinflussen, bedingt.

1.4 Der Mannoserezeptor

1.4.1 Bau des Mannoserezeptors und verwandte Strukturen

Es wurde bisher nur ein Mannose-Rezeptor im Humansystem beschrieben, welcher sich beispielsweise auf der Zytoplasmamembran der menschlichen Makrophagen und verschiedenen anderen Zellen im menschlichen Körper befindet. Er gehörte bislang zur Familie der Lectine. Seit kurzem wird er zu einer neudefinierten Gruppe von mustererkennenden Rezeptoren gezählt. Dieser Gruppe von mustererkennenden Oberflächenrezeptoren sind neben dem humanen Mannoserezeptor weitere Rezeptoren zugeordnet, welche mit ihm verwandt sind und ihm in ihrer Grundstruktur ähneln. Hier sind zu erwähnen der Phospholipase A2 Rezeptor (Ishizaki et al., 1994, Ancian et al., 1995), der Rezeptor DEC-205, welcher auf dendritischen Zellen zu finden ist (Inaba et al., 1995, Jiang et al., 1995, Swiggard et al., 1995), und ein weiterer Lectin-Rezeptor (Wu et al., 1996). Der humane Mannoserezeptor ist ein 185 kD Transmembran-Glycoprotein. Er wird als unreifer inaktiver Precursor synthetisiert und erlangt erst bei seiner Passage durch den Golgi-Apparat seine volle Funktionsfähigkeit (Stahl und Ezekowitz, 1998). Der Mannoserezeptor setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen (Ezekowitz et al., 1990): einem charakteristischen hydrophoben Signalpeptid, einer Cystein-reichen NH₂-Terminalregion, einer Fibronectin Typ II-ähnlichen Domäne, acht Lectin-artigen Kohlenhydrat-Erkennungs-Domänen, einer hydrophoben Transmembranregion und einem zytoplasmatischen Ende. Die Cystein-reiche NH₂-Terminalregion enthält in ihrer Aminosäure-Sequenz sechs Cysteine und zeigt keine Ähnlichkeiten mit irgendeiner bekannten Struktur. Über ihre Funktion ist lediglich bekannt, daß sie sulfatierte Glycoproteine oder Neoglycoproteine bindet, die mit der Sequenz SO₄-4GalNAcβ1,

4GlcNAc β 1 enden (Martínez-Pomares et al., 1996, Harris et al., 1992). Die genaue Aufgabe der Fibronectin Typ II-ähnlichen Domäne ist nicht ganz klar, sie könnte eine Rolle bei der Interaktion mit der extrazellulären Matrix spielen und die Verteilung und Adhäsion der Gewebsmakrophagen beeinflussen. Außerdem entspricht die Fibronectin-Sequenz einer Struktur, die von manchen Bakterien mittels Fibronectinrezeptor gebunden wird (Stahl, 1992). Die acht Lectin-ähnlichen Kohlenhydrat-Erkennungsdomänen dienen der Erkennung von Mannose und Fucose und sind untereinander zu etwa 30 Prozent homolog (Stahl und Ezekowitz, 1998). Das hydrophile zytoplasmatische Ende scheint eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Stoffen in die Zelle mittels Endozytose und Phagozytose zu spielen. In der Abbildung 1 ist eine Schemazeichnung des im Humansystem nachgewiesenen Mannoserezeptors dargestellt.

1.4.2 Vorkommen des Mannoserezeptors

Der Mannoserezeptor wurde als erstes auf Alveolarmakrophagen entdeckt (Stahl et al., 1978) und konnte bisher auf gewebeständigen Makrophagen (Stephenson et Shepherd, 1987), Endothelzellen (Bijsterbosch et al., 1996), glatten Muskelzellen der Trachea (Lew und Rattezzi, 1991, Lew et al., 1994), Pigmentzellen der Retina (Shepherd et al., 1991), Mesangium-Zellen in der Niere (Liu et al., 1996) und auf Kaposisarkom-Zellen (Uccini et al., 1997) gefunden werden, auf frischen Blutmonozyten wird er nicht exprimiert (Stahl und Ezekowitz, 1998). Der Mannoserezeptor konnte auch auf unreifen dendritischen Zellen entdeckt werden (Sallusto et al., 1995, Engering et al., 1997, Tan et al., 1997, Mommaas et al., 1999), allerdings nimmt seine Expression mit zunehmender Reifung der dendritischen Zellen ab (Dong et al., 1999).

1.4.3 Funktion des Mannoserezeptors

Der Mannoserezeptor besitzt eine hohe Affinität zu Mannose und Fucose, mittlere Affinität zu N-acetyl-glucosamin und Glucose, sowie geringe Affinität zu Galactose. Die Bindung der Liganden ist abhängig vom pH-Wert und von der Calciumkonzentration (Drickamer, 1988, Stahl, 1992). Die Bindung erfolgt bei neutralem pH-Wert, für die Freisetzung in entsprechenden Zellkompartimenten ist ein saurer pH-Wert notwendig. Der Mannoserezeptor vermittelt die Endozytose von mannosylierten Glycoprotein-Antigenen und fördert damit die Rezeptor-vermittelte

Antigenpräsentation. Er ermöglicht die Phagozytose (Ezekowitz et al., 1990) und aktiviert die Sekretion von Enzymen wie neutrale Proteinasen (Gordon und Ezekowitz, 1983) und Zytokinen wie Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) und IL-1 (Nathan, 1987). Mit seiner Fähigkeit, die Saccharide der Bakterienzellwand zu binden, spielt der Mannoserezeptor eine entscheidende Rolle bei der Abwehr von Pathogenen, wie *Mycobacterium tuberculosis* (Schlesinger, 1993), *Pneumocystis carinii* (Ezekowitz et al., 1991), *Candida albicans* (Marodi et al., 1993), *Leishmania promastigotes* (Blackwell et al., 1985) und *Trypanosoma cruzi* (Kahn et al., 1995). Der Mannoserezeptor scheint wie andere Lectine eine Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunität zu schaffen (Stahl und Ezekowitz, 1998), indem er sich auf den zur unspezifischen Abwehr gehörenden aber auf ihre Aufgabe hochspezialisierten antigenpräsentierenden Zellen befindet, diesen zur effizienten Antigenaufnahme verhilft und damit die Präsentation an die Zellen der spezifischen Abwehr fördert.

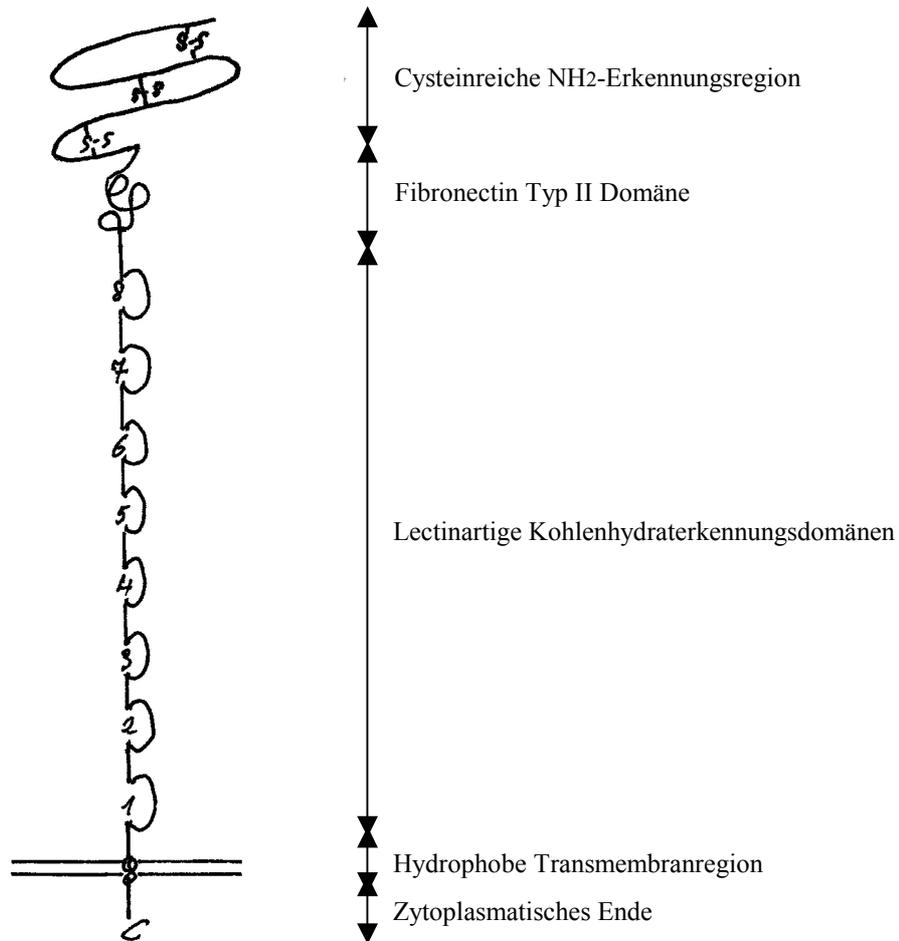


Abb.1.: Schemazeichnung zum Bau des humanen Mannoserezeptors

Der Mannoserezeptor besteht aus einem charakteristischen hydrophoben Signalpeptid, einer Cystein-reichen NH₂-Terminalregion, einer Fibronectin Typ II Domäne, acht Lectin-artigen Kohlenhydrat-Erkennungs-Domänen, einer hydrophoben Transmembranregion und einem zytoplasmatischen Ende (Stahl und Ezekowitz, 1998).

1.5 Fragestellung

Unreife dendritische Zellen gehören zu den wirksamsten antigenpräsentierenden Zellen des lebenden Organismus. Dies ist unter anderem auf den Besitz des Mannoserezeptors zurückzuführen, der ihnen die Aufnahme von mannoseverknüpften Proteinen auch bei sehr geringer Konzentration im umgebenden Milieu ermöglicht. Die bislang am besten untersuchten dendritischen Zellen der Epidermis sind die Langerhans-Zellen. Eine zweite Population dendritischer Zellen in der Haut, die IDEC, tritt fast ausschließlich in entzündlichen Läsionen auf. Die Abstammung, die Verwandtschaft zu anderen Zelltypen und Funktion dieser Zellen sind bislang nicht genau bekannt. Um mehr Daten über die IDEC zu gewinnen, soll der Mannoserezeptor auf ihnen gesucht und die ihnen zur Verfügung stehenden Endozytose-Mechanismen ermittelt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden APAAP-Färbungen an Schnitten gesunder und entzündlicher Haut durchgeführt sowie durchflußzytometrische Untersuchungen an Langerhans-Zellen und IDEC, Monozyten und MoDC's vorgenommen, um die folgenden Fragen zu beantworten:

Läßt sich der humane Mannoserezeptor auf den Monozyten und MoDC's nachweisen? Befindet sich der Mannoserezeptor auf Langerhans-Zellen und IDEC? Falls sich der Rezeptor auf den dendritischen Zellen der Epidermis zur Darstellung bringen läßt, bestehen Unterschiede in seiner Expression zwischen verschiedenen Hauterkrankungen?

Läßt sich, falls sich dieser Rezeptor auf den Langerhans-Zellen und IDEC befindet, eine durch diesen Rezeptor vermittelte Endozytose neben der Pinozytose nachweisen? Zeigen auch Monozyten und MoDC's diese Form der Endozytose?

Wenn sich eine durch den Mannoserezeptor mediierte Endozytose darstellen läßt, ist der Mannoserezeptor durch das bakterielle Polysaccharid Mannan so zu blockieren, daß er nicht mehr für die Endozytose zur Verfügung steht?

Besitzen Langerhans-Zellen und IDEC die Fähigkeit, Bakterien, zum Beispiel E.coli zu phagozytieren? Kann eine E.coli-Aufnahme bei den Monozyten und MoDC's gezeigt werden?

2 Material und Methoden

2.1 Gewinnung der Biopsie aus entzündeter Haut

Die Normalhautproben wurden aus überschüssiger Spalthaut, welche bei Operationen anfiel, von Patienten der Dermatologischen Klinik gewonnen (n=8). Die Biopsien aus den entzündlichen Hautläsionen (n=26) wurden, im Einvernehmen mit der Ethikkommission, bei Patienten der Dermatologischen Klinik der Universität nach deren schriftlicher Einverständniserklärung durchgeführt. Bei den in Lokalanästhesie vorgenommenen Biopsien wurde mit einem Skalpell ein etwa einen Quadratzentimeter großes Stück der Epidermis durch eine sehr flache Schnittführung entfernt und vor der weiteren Bearbeitung in einer Petrischale mit unsterilem PBS (Rezept im Anhang) mechanisch gereinigt. Es handelte sich bei den Hautveränderungen um atopisches Ekzem (n=5), Psoriasis vulgaris (n=8) und allergische Kontaktdermatitis (n=3) sowie andere Hauterkrankungen (n=10). Die Hautläsionen waren seit mindestens 14 Tagen nicht äußerlich oder innerlich mit Glucocorticoiden behandelt worden oder sie waren noch gänzlich unbehandelt.

2.2 Immunfärbung von Hautschnitten mit der APAAP-Technik

2.2.1 Herstellung der Hautschnitte am Kryomikrotom

Die Probe wurde mittels gekühltem Klebstoff auf den Teller aufgebracht, ohne daß die Biopsie hierbei auftaute. Es wurden die Schnitte für die Färbung angefertigt und mit dem Objektträger direkt vom Messerblock des Kryomikrotoms abgenommen.

2.2.2 Färbung der Hautschnitte in der APAAP-Technik

Mit dieser Technik kann ein bestimmtes Antigen, hier der Mannoserezeptor, an einem Gewebeschnitt in situ sichtbar gemacht werden. Das Prinzip der APAAP-Färbung besteht darin, das Antigen auf den Zellen durch einen spezifischen Antikörper, den Primärantikörper zu markieren und daran einen Sekundärantikörper zu koppeln, welcher als Bindeglied zwischen dem Primärantikörper und dem anschließend zugegebenen APAAP-Komplex (Dako, Kopenhagen, Dänemark, Herstellung der APAAP-Lösung im Anhang) fungiert. Der APAAP-Komplex besteht aus alkalischer Phosphatase und einem Antikörper gegen diese Phosphatase. Der Antikörper bindet den APAAP-Komplex an den Sekundärantikörper, das Enzym wird durch eine

Substrat-Chromogen-Reaktion sichtbar gemacht. Vor Beginn der Färbung wurden die Kryomikrotomschnitte für ein bis zwei Stunden lufttrocknen gelassen, da sie nach dem Schneiden kondensiert waren. Zunächst wurde mit dem Wachsstift (Dako-Pen, Dako, Kopenhagen, Dänemark) ein Kreis um die Hautschnitte auf den Objektträgern gezogen. Anschließend wurden die Schnitte für zehn Minuten bei Raumtemperatur in Aceton (Merck, Ismaning) eingelegt und für zehn Minuten lufttrocknen gelassen. Die Schnitte wurden für 60 Minuten mit dem Primärantikörper, dem für den Mannose-Rezeptor spezifischen Antikörper D547 (IgG1, freundlicherweise von A. Lanzavecchia, Basel, überlassen) in einer Konzentration 10µg/ml (Verdünnung im Anhang) in der feuchten Kammer (Sigma, Deisenhofen) inkubiert. Als Isotypkontrolle diente der monoklonale Antikörper MOPC-21, ebenfalls in einer Konzentration von 10µg/ml (IgG1 Sigma, Deisenhofen, Verdünnung im Anhang). Nach dieser Inkubation wurden die Objektträger zweimal mit TRIS-Puffer (Dako, Kopenhagen, Dänemark, Rezept im Anhang) beträufelt, um den Primärantikörper herunterzuwaschen. Sodann erfolgte eine Inkubation mit einem Rabbit-anti-Mouse-Brücken-Antikörper (R-a-M, Dako, Kopenhagen, Rezept im Anhang), dem Sekundärantikörper, in der feuchten Kammer für 30 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte für 30 Minuten mit APAAP inkubiert. Die Inkubation mit R-a-M und APAAP wurde wiederholt, um eine ausreichende Bindung dieser Substanzen an den Primärantikörper zu gewährleisten. Anschließend wurden die Hautproben für 20 Minuten in die Entwicklungslösung (Herstellung im Anhang) gegeben und nach Reinigung mit TRIS-Puffer und Aqua dest. in Hämalaun (Sigma, Deisenhofen) gefärbt. Die Präparate wurden durch Aufbringen eines Tropfens auf 37°C erwärmter Glycerin-Gelatine (Merck, Ismaning) eingebettet und mit einem Deckglas versehen.

2.3 Gewinnung von Monozyten aus peripherem Blut

Es standen zwei verschiedene Methoden zur Isolierung von mononukleären Zellen aus Venenblut zur Verfügung. Wurden die Zellen für die Phänotypisierung oder für funktionelle Versuche zur Pinozytose oder Phagozytose verwendet, so wurden sie über Dextran (6%, Sigma, Deisenhofen) und Nycoprep (Nycomed, Oslo, Norwegen) isoliert. Wurden die Monozyten dagegen für die Rezeptor-vermittelte Endozytose und deren Hemmung eingesetzt, so wurde eine Isolation mit Ficoll (Seromed, Berlin)

gewählt, um eine Aufnahme von Dextran in die Zellen vor dem eigentlichen Versuch zu verhindern.

2.3.1 Gewinnung von Monozyten unter Verwendung von Dextran und Nycoprep

Das Venenblut wurde mittels Monovetten (Kalium-EDTA-Blut) entnommen und sofort weiterverarbeitet. Für einen Versuch wurden 100ml Blut entnommen, aus welchen sich jeweils 1-2 Millionen Monozyten isolieren ließen. Das Blut wurde in 50ml-Zentrifugenröhrchen (Falcon Labware, Lincoln Park, USA) transferiert. Auf zehn Teile Blut wurde ein Teil Dextran 6% gegeben. Nachdem die Erythrozyten abgesunken waren, wurde das Plasma mit einer Einmalpipette und dem Pipettiergerät vorsichtig abgezogen und auf Nycoprep überschichtet. Das Verhältnis von Nycoprep zu Plasma betrug dabei eins zu zwei. Das überschichtete Blutplasma wurde 15 Minuten lang bei 700g und Raumtemperatur ohne Bremse in der Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen) zentrifugiert. Anschließend wurde die Interphaseschicht, welche die Monozyten enthielt, zusammen mit einem Großteil des Nycoprep vorsichtig abgezogen und in ein neues 50ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Das Röhrchen wurde mit Monozyten-Waschmedium (Rezept im Anhang) auf 50ml aufgefüllt und für zehn Minuten bei 140g und Raumtemperatur zentrifugiert. Währenddessen wurde die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden noch zweimal in Monozyten-Waschmedium gewaschen und so resuspendiert, daß sich in einem Milliliter eine Million Zellen befanden.

2.3.2 Gewinnung von Monozyten unter Verwendung von Ficoll

Es wurden mit einer heparinisierten Einwegspritze 10ml venöses Blut entnommen und sofort weiterverarbeitet. Das Blut wurde in zwei 10ml-Zentrifugenröhrchen (Falcon Labware, Lincoln Park, USA) auf je fünf Milliliter Ficoll überschichtet. Die Röhrchen wurden bei Raumtemperatur und 1500g für 20 Minuten zentrifugiert, die Zentrifuge wurde nach Beendigung dieses Vorganges nicht gebremst. Nach diesem Schritt befanden sich im Röhrchen die mononukleären Zellen als Interphase in der Mitte zwischen dem Blutplasma und dem Ficoll. Nach Vorlage von 20ml Waschmedium in einem 50ml-Zentrifugenröhrchen, wurde die Interphase mit einer sterilen Einmal-Pasteurpipette abgezogen und in das vorbereitete Waschmedium

transferiert. Das Röhrchen wurde auf 50ml mit Waschmedium aufgefüllt und bei Raumtemperatur und 220g für fünf Minuten zentrifugiert. Währenddessen wurde die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden nochmals mit Waschmedium gewaschen und so resuspendiert, daß sich eine Million Zellen in einem Milliliter Medium befanden.

2.4 Gewinnung von monozytären dendritischen Zellen aus Monozyten

Die Monozyten wurden, wie in 2.2.1.1. beschrieben, unter Verwendung von Dextran und Nycoprep aus dem peripheren Blut isoliert. Unter der sterilen Werkbank wurden die gewonnenen Zellen so resuspendiert, daß sich in einem Milliliter Kulturmedium (Rezept im Anhang) eine Million Zellen befanden. Je ein Milliliter der Zellsuspension wurde in ein Feld der Kulturplatte (Costar, Coming, USA) pipettiert. Zu den Zellen wurden je 2µl IL-4 (Gibco, Paisley, Schottland, Herstellung der Gebrauchslösung im Anhang) entsprechend einer Konzentration von Konzentration 500U/ml im Kulturmedium und je 3µl GM-CSF (Leucomax von Sandoz, Basel, Schweiz, Herstellung der Gebrauchslösung im Anhang) entsprechend einer Konzentration von 500U/ml im Kulturmedium gegeben. Die Platte wurde im Brutschrank für insgesamt sechs Tage bei 37°C, und einem CO₂-Gehalt von 5% bebrütet. Am zweiten und am vierten Tag der Kultur wurde jeweils die Hälfte des Kulturmediums durch frisches ersetzt und es wurden beide Male 1µl IL-4 und 1,5µl GM-CSF zu den Zellen hinzupipettiert. Am sechsten Tag der Kultur wurden die MoDC's für die unten beschriebenen Versuche verwendet.

2.5 Präparation der Einzelzellsuspension aus Spalthaut und entzündlicher Haut

Direkt nach der Entnahme der Shave-Biopsie wurden die Proben bearbeitet. Die entnommenen Biopsien wurden in einer Petrischale mit unsterilem PBS (Rezept im Anhang) mechanisch gereinigt und in eine neue Petrischale gegeben. Die Haut wurde in zwei bis drei Millimeter breite Streifen geschnitten und mit 200µl 0,5% Trypsin-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Verdünnung im Anhang) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Epidermis der Hautstreifen von der Dermis getrennt und in ein 10ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Es wurden 2ml RPMI-Lösung

(Rezept im Anhang) und 200µl boviner DNase Typ IV (Sigma, Deisenhofen, 0,1%, Herstellung der Lösung im Anhang) zugegeben. Das Röhrchen wurde nach kurzem Schütteln auf dem Vortex-Mischer für drei Minuten im Brutschrank bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% inkubiert. Anschließend wurde die Probe eine Minute lang vorsichtig auf dem Vortex-Mischer geschüttelt. Die dadurch erhaltene Zellsuspension wurde durch ein 50µm Nylonnetz in ein neues Röhrchen pipettiert, das Volumen mit Waschmedium auf 10ml aufgefüllt. Die Zellen wurden fünf Minuten lang bei 200g und Raumtemperatur zentrifugiert. Währenddessen wurde in der Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Für die Zellfärbung wurden je nach gewonnener Zellzahl 200.000-500.000 Zellen in einem Volumen von 100µl in ein FACS-Röhrchen (Falcon Labware, Lincoln Park, USA) gegeben. Die FACS-Röhrchen befanden sich dabei im Eiswasserbad. Die Zellen wurden vor Beginn der Phänotypisierung mit FACS-Puffer (Rezept im Anhang), vor Beginn der Endozytose-Versuche mit RPMI-Waschmedium (Seromed, Berlin, Herstellung der Gebrauchslösung im Anhang) gewaschen.

2.6 Phänotypisierung

Die Phänotypisierung wurde sowohl mit Zellen aus der normalen und der entzündlichen Haut, als auch mit Monozyten und MoDC's vorgenommen.

2.6.1 Färbung der Zellen

Die Hautzellen lagen in den Probenröhrchen in einer Anzahl von 200.000-500.000 Zellen vor, die Monozyten und MoDC's in einer Anzahl von 100.000 Zellen pro Röhrchen, das Volumen betrug jeweils 100µl. Es wurde eine indirekte Dreifarben-Fluoreszenzfärbung zur Anfärbung der CD1a positiven Zellen vorgenommen. Zunächst wurden die Zellen für 30 Minuten mit dem Primärantikörper, dem spezifischen Antikörper D547 des Mannoserezeptors, inkubiert. Die Konzentration des Antikörpers betrug hierbei 2µg/ml, die zugegebene Menge 5µl (Aufbereitung im Anhang). Nachdem der Primärantikörper mittels FACS-Puffer heruntergewaschen worden war, wurden die Zellen mit dem Sekundärantikörper GaM/FITC (Jackson, West Grove, PA, USA, Menge 5µl, Konzentration 50µg/ml, Verdünnung im Anhang) für 30 Minuten inkubiert. Durch nochmaliges Waschen mit FACS-Puffer wurde ungebundener Sekundärantikörper entfernt. Anschließend wurden ungebundene Bindungsstellen des Sekundärantikörpers mit Maus-Serum (Dianova, Hamburg,

Verdünnung 1/30, Menge 5µl, Inkubationszeit 20 Minuten) geblockt. Die Zellen wurden danach ein weiteres Mal mit FACS-Puffer gewaschen und, sofern es sich um Hautzellen oder MoDC's handelte, mit Phycoerythrin (PE) konjugiertem T6RD1-Antikörper (IgG1, Coulter, Krefeld) und 7-Amino-Acetinomycin-D (7AAD, Sigma, Deisenhofen) gefärbt, diese Stoffe lagen in einem vorgefertigten Gemisch, CD1a-Premix (Herstellung im Anhang), vor. Der T6RD1-Antikörper diente der Anfärbung des Rezeptors CD1a, dem Erkennungsmerkmal der dendritischen Zellen, 7AAD wurde als Vitalfarbstoff benutzt. Es handelt sich hierbei um einen DNA-Farbstoff, der nicht in lebende, sondern nur in tote Zellen gelangen kann und somit die toten Zellen anfärbt. Die Konzentration für T6RD1 und 7AAD betrug jeweils 1µg/ml. Die Isotypkontrolle wurde mit unspezifischem IgG1RD1 (Coulter, Krefeld) anstelle des PE konjugierten T6RD1 durchgeführt. Wurde die Phänotypsierung mit frischen Monozyten durchgeführt, so wurde zur Färbung dieser CD1a-negativen Zellen ein anderes vorgefertigtes Farbstoff-Gemisch, CD14-Premix (Herstellung im Anhang), verwendet. Es enthielt neben 7AAD den PE-konjugierten CD14-Antikörper Leu-M3 (IgG2b, Beckton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Es wurden jeweils 5µl dieser Farbstoff-Gemische hinzupipettiert, die Inkubationszeit betrug 30 Minuten. Nach dem letzten Färbeschritt wurden alle Zellen nochmals mit FACS-Puffer gewaschen. Die Röhrchen mit den Zellen standen während der gesamten Färbung im Eiswasserbad bei 4°C. Die Inkubation fand jeweils im Dunklen statt.

2.6.2 Analyse der Zellen am Durchflußzytometer

Die unfixierten Zellen wurden an einem FACScan Durchflußzytometer unter Verwendung des CellQuest-Programmes (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) analysiert. Um eventuell vorhandene Zellaggregate von der Analyse auszuschließen, wurde ein Fenster gesetzt, welches auf den morphologischen Eigenschaften der Zellen basierte. Hierzu wurden die Vorwärtslichtstreuung, englisch forward scatter (FSC), zur Erfassung der Zellgröße und die Seitwärtslichtstreuung, englisch side scatter (SSC), zur Erfassung der Granularität der Zellen, gegeneinander dargestellt. Die lebenden CD1a-positiven dendritischen Zellen, Langerhans-Zellen, IDEC und MoDC's, wurden durch eine Kombination des Einzelzell-Fensters (FSC gegen SSC) und einem Fenster für lebende dendritische Zellen (FL2 gegen FL3) abgegrenzt. Dabei wurde im Fluoreszenz-Kanal FL2 der an den T6RD1-Antikörper

gegen den Rezeptor CD1a gebundene Farbstoff Phycoerythrin und im Fluoreszenz-Kanal FL3 der DNA-Farbstoff 7AAD zum Ausschluß der toten Zellen erfaßt. Analog wurde bei den CD14-positiven Monozyten FSC und SSC dargestellt und dieses Einzelzell-Fenster mit einem Fenster für die lebenden Zellen kombiniert. Dabei wurde im Fluoreszenzkanal FL2 das Phycoerythrin, welches an den Leu-M3-Antikörper gegen den CD14-Rezeptor gebunden war, und im Fluoreszenzkanal FL3 der Farbstoff 7AAD registriert. Der ebenfalls an Phycoerythrin gebundene Antikörper IgG1RD1 wurde bei beiden Zelltypen als Kontrolle des gesetzten Fensters in einem gesonderten Probenröhrchen mitgeführt. Der Farbstoff FITC, gebunden an den Sekundärantikörper, wurde im Fluoreszenz-Kanal FL1 gemessen. Die Röhrchen mit den Zellsuspensionen wurden bis zur Analyse am Durchflußzytometer im Dunklen bei 4°C im Eiswasserbad aufbewahrt.

2.6.3 Auswertung

Zur Auswertung fand das Lysis-II Programm der Firma Becton Dickinson Verwendung. Um die Expression des Mannoserezeptors bei der Phänotypisierung sowie das Maß der Endozytose bei den funktionellen Versuchen quantitativ auswerten zu können, wurde eine zweidimensionale Dot Plot Analyse durchgeführt, wobei alle CD1a-positiven Zellen manuell von den übrigen Zellen wie Keratinozyten und toten Zellen abgegrenzt wurden. Des Weiteren wurden, in den Proben aus der entzündlichen Haut, die Langerhans-Zellen und die IDEC, erkennbar an ihrer unterschiedlichen CD1a-Expression, voneinander getrennt. Bei der Auswertung der Versuche an Monozyten aus frischem Blut konnten diese CD14-positiven Zellen deutlich von den anderen mit eingemessenen Zellen abgegrenzt werden, die nach Kultur erhaltenen MoDC's, als dendritische Zellen CD1a-positiv, ließen sich ebenfalls gut darstellen. Es wurde die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) des Signals aus dem Kanal FL1 bestimmt und daraus die relative Fluoreszenz-Intensität (rFI) für den Oberflächenrezeptor errechnet:

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

Diese Berechnung zur Normierung ist wichtig, da sie den gesamten Versuchsablauf gegen kleine tägliche Schwankungen relativ störunanfällig macht.

2.6.4 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Ergebnisse werden als arithmetischer Mittelwert plusminus Standardabweichung dargestellt.

2.7 Endozytose

2.7.1 Pinozytose

Dieser Versuch wurde mit Zellen aus gesunder und entzündlicher Haut sowie an Monozyten und MoDC's durchgeführt. Die Hautzellen wurden aus der Epidermis, wie unter 2.2.1.1. dargestellt, gewonnen. In jedes FACS-Röhrchen wurden 200.000-500 000 Zellen in einem Volumen von 100µl gegeben. Die Monozyten wurden, wie unter 2.2.3.1. ausgeführt, aus dem frischen Venenblut isoliert, die MoDC's wurden, wie unter 2.2.4. beschrieben, am sechsten Tag der Kultur verwendet. Dabei lagen in jedem der vier benötigten Röhrchen 100.000 Zellen in einem Volumen von 100µl vor. Die Zellen wurden mit Ausnahme der Inkubation während des gesamten Versuchablaufs im Eiswasserbad belassen. Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen einmal in RPMI-Medium (Seromed, Berlin) gewaschen. Nachdem die Zellen im Eiswasserbad 20 Minuten lang gekühlt worden waren, wurden in jedes Röhrchen 10µl des Farbstoffes Lucifer Yellow (MoBiTec, Göttingen, 2,5mg/ml, Verdünnung im Anhang) pipettiert. Lucifer Yellow ist ein rezeptorunabhängiger Farbstoff, er gelangt somit ausschließlich durch Pinozytose in die Zelle. Ein Röhrchen wurde im Eiswasserbad stengelassen, die übrigen für drei, sieben, und 30 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen einmal mit kaltem (4°C) FACS-Puffer gewaschen, nach Beendigung aller Inkubationszeiten wurden die Zellen je dreimal mit FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen aus normaler und entzündlicher Haut sowie die MoDC's 30 Minuten lang mit jeweils 5µl CD1a-Premix inkubiert. Hierbei diente der im Gemisch enthaltene T6RD1-Antikörper zur Identifizierung der CD1a-positiven Zellen, der Farbstoff 7AAD zum Ausschluß der toten Zellen. Die frischen Monozyten wurden 30 Minuten lang mit CD14-Premix (5µl pro Röhrchen) inkubiert. Bis zur Analyse am Durchflußzytometer wurden die Zellen im Eiswasserbad aufbewahrt.

2.7.2 Rezeptor-vermittelte Endozytose

Auch die Versuche zur Rezeptor-vermittelten Endozytose wurden sowohl mit Zellen aus normaler und entzündlich veränderter Haut, als auch mit Monozyten und MoDC's durchgeführt. Die Einzelzellsuspensionen der Hautzellen wurden, wie oben beschrieben, hergestellt und in den oben bereits angegebenen Anzahlen und Volumina auf insgesamt vier FACS-Röhrchen verteilt. Die MoDC's wurden wiederum am sechsten Tag der Kultur den Experimenten zugeführt. In jedem FACS-Röhrchen befanden sich 100.000 Zellen in 100µl Medium, gekühlt im Eiswasserbad bei 4°C. Zu den Zellen wurde Dextran-FITC (MoBiTec, Göttingen, 1,0mg/ml, Verdünnung im Anhang) hinzupipettiert. Dextran-FITC bindet an den Mannoserezeptor und wird über diesen und die gleichzeitig stattfindende Pinozytose in die Zelle aufgenommen. Ein Röhrchen wurde im Eiswasserbad als Kontrolle belassen, die übrigen im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Um die Dextran-FITC-Aufnahme pro Zeit darstellen zu können, wurde je ein Röhrchen drei, sieben und 30 Minuten inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen sofort in das Eiswasserbad transferiert und insgesamt vier Mal mit FACS-Puffer gewaschen. Es wurden die Hautzellen und die MoDC's mit CD1a-Premix, die Monozyten mit CD14-Premix inkubiert. Bis zum Analysieren am Durchflußzytometer wurden die Zellen im Eiswasserbad aufbewahrt.

2.7.3 Hemmung der Rezeptor-vermittelten Endozytose

Dextran-FITC wird nicht nur an den Mannoserezeptor gebunden in die Zelle aufgenommen, sondern auch durch die gleichzeitig neben der Rezeptor-vermittelten Endozytose stattfindenden Pinozytose. Um diesen Anteil der unspezifischen Aufnahme des Farbstoffes von der durch den Mannoserezeptor vermittelten Endozytose abzugrenzen, wurde der Mannoserezeptor vor der Inkubation der Zellen mit Dextran-FITC durch das an ihn bindende Mannan, ein bakterielles Polysaccharid, blockiert. Da der Mannoserezeptor durch diese Blockade der Zelle nicht mehr für die Endozytose zur Verfügung stand, war die in diesem Experiment in den Zellen nachgewiesene Farbstoffmenge durch Pinozytose einverleibt worden. Der Anteil der Rezeptor-vermittelten Endozytose kann bestimmt werden, wenn die Dextranmenge, welche trotz der Hemmung des Rezeptors in die Zelle gelangte, von derjenigen, welche ohne vorangegangene Rezeptorblockierung in die Zelle aufgenommen wurde,

abgezogen wird. Der Versuch zum Nachweis der Rezeptor-vermittelten Endozytose wurde wie oben beschrieben mit Hautzellen sowie Monozyten und MoDC's durchgeführt. Um die Bindung von Dextran-FITC an den Mannoserezeptor zu blockieren, wurden alle Röhrchen für zehn Minuten mit Mannan (Sigma Immunochemicals, St. Louis, MO, USA, 1,0mg/ml 10µl/Röhrchen) bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden alle Röhrchen sofort in das Eiswasserbad gestellt. Die Zellen wurden mit RPMI-Lösung einmal gewaschen, anschließend wurde Dextran-FITC wie oben beschrieben zugegeben. Alle weiteren Schritte wurden wie beim Versuch zur Rezeptor-vermittelten Endozytose vorgenommen.

2.7.4 Phagozytose

Die Zellen wurden, wie unter 2.2.1.1. beschrieben, aus der Hautprobe gewonnen, wobei für dieses Experiment nur Proben aus entzündlicher Haut verwendet wurden. In jedes der beiden FACS-Röhrchen wurden 200.000 Zellen in einem Volumen von 100µl pipettiert. Es wurden auch Monozyten und MoDC's auf ihre Phagozytose-Fähigkeit untersucht. Die Zellen wurden einmal mit RPMI-Medium gewaschen. Sodann wurden 20µl einer stabilisierten, FITC-markierten Suspension der mit Antikörpern und Komplement opsonisierten E.coli (Phagotest, Orpegen Pharma, Heidelberg, 1×10^9 Bakterien/ml) zu beiden Röhrchen hinzupipettiert. Ein Röhrchen wurde im Eiswasserbad belassen, das andere für zehn Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Röhrchen sofort in das Eiswasserbad transferiert, und die Phagozytose mit jeweils 100µl Lösung aus dem Phagozytose-Testset gestoppt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit FACS-Puffer gewaschen. Die CD1a-positiven dendritischen Zellen der Haut sowie die MoDC's wurden mit CD1a-Premix gefärbt, die CD1a-negativen Monozyten wurden mit CD14-Premix inkubiert. Bis zur Analyse am Durchflußzytometer wurden die Proben-Röhrchen im Eiswasserbad gekühlt.

2.7.5 Analyse der funktionellen Endozytose-Versuche am Durchflußzytometer

Die Erfassung der Fluoreszenz-Intensitäten, die Auswertung der Daten, die Berechnung des rFI und die statistische Auswertung erfolgte wie unter 2.2.6.2. bis 2.2.6.4. bereits beschrieben.

Das im Fluoreszenzkanal FL1 registrierte FITC war bei den Versuchen zur Endozytose an das Dextran beziehungsweise an die opsonisierten E.coli gebunden. LY wurde ebenfalls im Fluoreszenzkanal FL1 gemessen.

3 Ergebnisse

3.1 Immunphänotyp der Zellen

3.1.1 Immunhistochemische Färbung von Hautschnitten mit der APAAP-Technik

Durch immunhistochemische Färbungen sollte untersucht werden, ob sich in gesunder und entzündlicher Haut Zellen, welche den Mannoserezeptor exprimieren, nachweisen lassen. An diesen den Mannoserezeptor tragenden Zellen sollte durch die Färbung die Morphologie in situ und die Lokalisation der Zellen dargestellt werden.

3.1.1.1 Der Mannoserezeptor wird in der normalen Epidermis nicht exprimiert

An den Schnitten, die aus Proben normaler Haut hergestellt wurden, ließen sich wenige Zellen, welche den Mannoserezeptor exprimieren in der Dermis durch Bindung des spezifischen Antikörpers D547 anfärben. In der Epidermis konnten bei derselben Färbung keine Zellen gesehen werden. Wurden die Schnitte mit dem monoklonalen Antikörper MOPC-21 inkubiert, konnten keine Reaktionen von Hautzellen beobachtet werden. In der Abbildung 2a ist ein histologischer Schnitt, angefertigt aus einer Normalhautprobe und gefärbt mit D547, zu sehen.

3.1.1.2 Dendritische Zellen in entzündlicher Haut exprimieren den Mannoserezeptor

In Proben, welche aus entzündlichen Hautläsionen bei atopischem Ekzem und Psoriasis vulgaris entnommen worden waren, konnten Zellen, welche den Mannoserezeptor exprimieren, durch Bindung des spezifischen Antikörpers D547 in situ dargestellt werden. Diese Zellen wiesen morphologisch eine dendritische Form auf und zeigten sich in der Epidermis sowie in der Dermis. In der Epidermis waren sie in den suprabasalen und in den basalen Schichten zu finden. In der Dermis konnten deutlich mehr Zellen als in der Epidermis gesehen werden. Im Gegensatz zur normalen Haut enthält die entzündliche Haut somit den Mannoserezeptor auf ihrer Oberfläche tragende dendritische Zellen. Es konnte nicht festgestellt werden, ob es sich bei den angefärbten Zellen um Langerhans-Zellen oder um IDEC handelt. In der Isotypkontrolle mit dem unspezifischen Antikörper MOPC-21 konnten wiederum

keine Zellen angefärbt werden. Die Abbildung 2b zeigt einen histologischen Schnitt aus entzündlich veränderter Haut bei atopischem Ekzem, die Abbildung 2c einen Schnitt aus einer Probe entzündeter Haut bei Psoriasis vulgaris, jeweils nach Anfärbung mit D547 in APAAP-Technik.

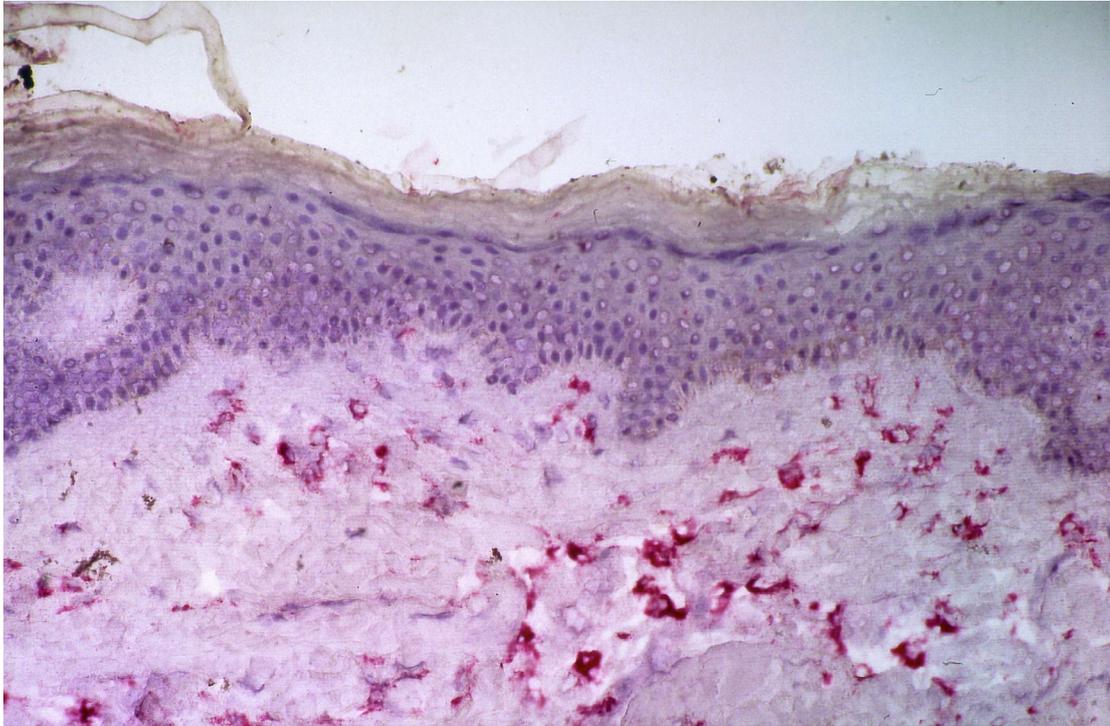


Abb.2a APAAP-Färbung an einem Schnitt aus gesunder Haut

In den Gefrierschnitten, die aus normaler Haut, wie unter Material und Methoden beschrieben, angefertigt und in der APAAP-Technik mit dem spezifischen Antikörper D547 gefärbt wurden, lassen sich nur wenige den Mannoserezeptor exprimierende Zellen in der Dermis erkennen. In der Epidermis finden sich keine mannoserezeptorpositiven Zellen.

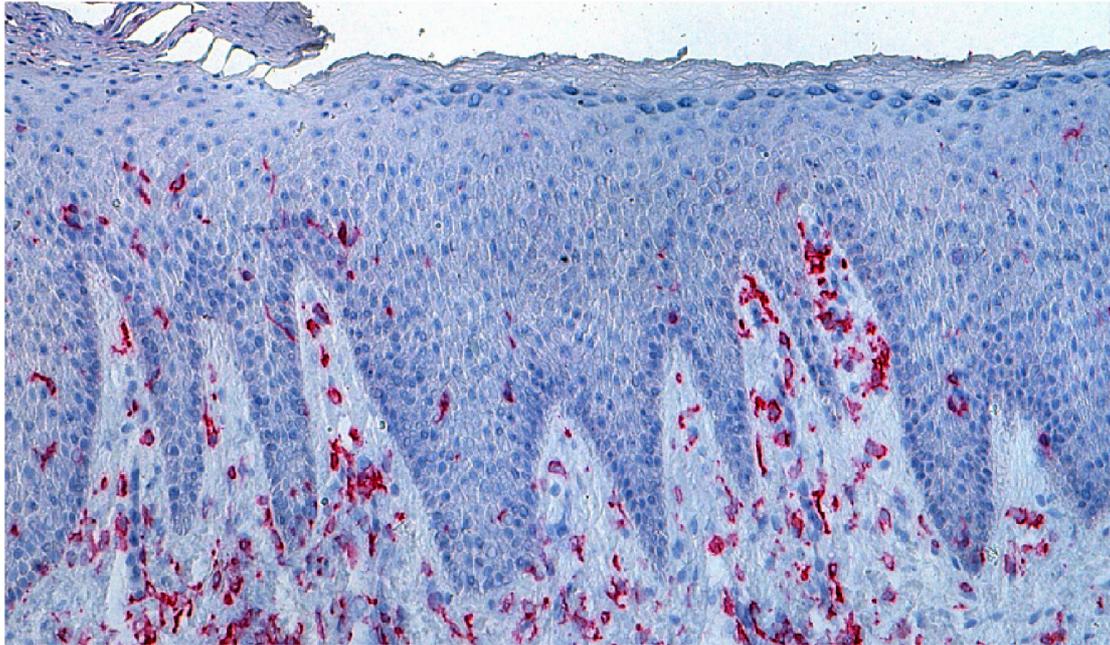


Abb.2b APAAP-Färbung an einem Schnitt aus entzündlich veränderter Haut bei atopischem Ekzem

Gefrierschnitte aus Proben entzündlicher Haut, APAAP-Technik mit dem spezifischen Antikörper D547. In der Epidermis und Dermis der entzündeten Haut dendritische Zellen, welche den Mannoserezeptor exprimieren.

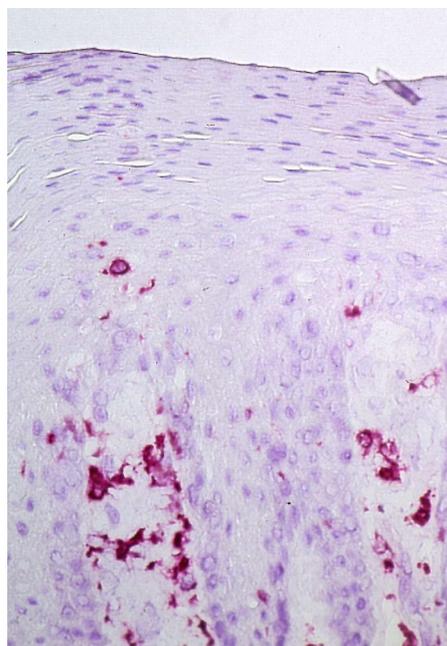


Abb.2c APAAP-Färbung an einem Schnitt aus entzündlich veränderter Haut bei Psoriasis vulgaris

Entzündlich veränderte Haut bei Psoriasis vulgaris, APAAP-Färbung mit dem spezifischen Antikörper D547. Dendritisch geformte Zellen in der Epidermis sowie in der Dermis, welche den Mannose-Rezeptor exprimieren.

3.1.2 Durchflußzytometrische Färbungen

3.1.2.1 Phänotypischer Nachweis des Mannoserezeptors nur auf monozytären dendritischen Zellen, nicht auf Monozyten

Durch Inkubation der Monozyten und der MoDC's mit D547 sollte untersucht werden, ob sich dieser Rezeptor auf der Oberfläche dieser beiden Zellarten finden läßt. Als Negativkontrolle wurden Monozyten oder MoDC's mit dem Antikörper IgG1 inkubiert. Bei der Inkubation der Monozyten mit D547 konnte keine Zunahme der relativen Fluoreszenz-Intensität gegenüber der Negativkontrolle festgestellt werden. Bei der Anfärbung der MoDC's mit D547 zeigte sich eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz-Aktivität gegenüber der Anfärbung mit IgG1. Die Expression des Mannoserezeptors konnte somit auf den MoDC's durch den spezifischen Antikörper D547 nachgewiesen werden, auf den frisch isolierten Monozyten konnte dagegen mit diesem Antikörper keine Expression des Mannoserezeptors gezeigt werden (Abb.3a und b).

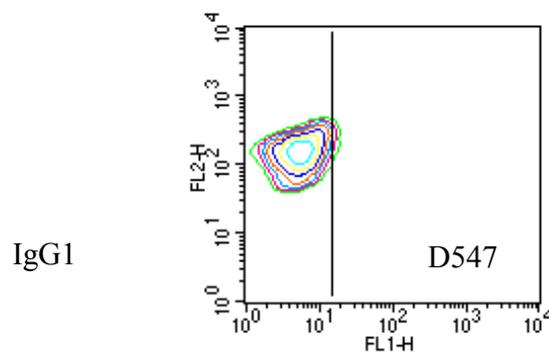


Abb.3a Immunphänotypisierung der Monozyten

Frische Blutmonozyten wurden mit dem spezifischen Antikörper D547 und dem Kontroll-Antikörper IgG1 inkubiert. Die beiden Contour-Plots zeigen die für den Mannoserezeptor spezifische Grünfluoreszenz (FL1), welche gegen die für CD14 spezifische Orangefluoreszenz (FL2) aufgetragen ist. Die beiden Contour-Plots liegen an gleicher Stelle. Dies bedeutet gleiche Fluoreszenz-Intensität bei beiden Färbungen. Der Mannoserezeptor konnte somit nicht durch D547 auf den Monozyten nachgewiesen werden.

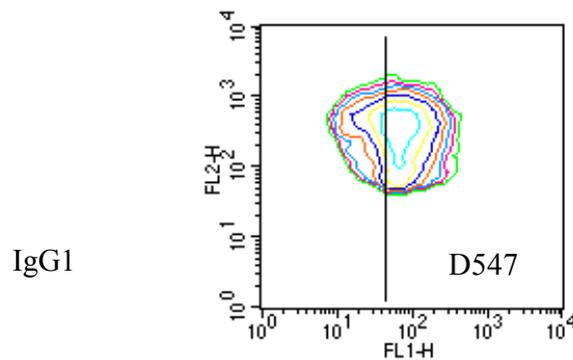


Abb.3b Immunphänotypisierung der MoDC's

Immunphänotypisierung an MoDC's als Contour-Plots. Die für den Mannoserezeptor spezifische Grünfluoreszenz wurde im Fluoreszenzkanal 1 erfaßt, die für CD 1a spezifische Orangethuoreszenz im Fluoreszenzkanal 2. Beide sind gegeneinander aufgetragen. Die Zellen, welche mit dem Antikörper D547 inkubiert worden waren, zeigen eine stärkere Fluoreszenz-Intensität als die Kontrollzellen nach Inkubation mit dem Antikörper IgG1. Der Mannoserezeptor ließ sich im Versuch durch Bindung des Antikörpers D547 auf der Zelloberfläche zur Darstellung bringen.

3.1.2.2 Die dendritischen Zellen in der normalen Haut exprimieren den Mannoserezeptor nicht

Analog zu dem Versuch an Monozyten und MoDC's sollte durch Inkubation mit D547 untersucht werden, ob Langerhans-Zellen, welche aus normaler Haut gewonnen worden waren, diesen Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Als Negativkontrolle wurden Zellen mit dem Antikörper IgG1 inkubiert. Bei der Analyse der Einzelzellsuspensionen am Durchflußzytometer zeigte sich bei den mit dem spezifischen Antikörper D547 inkubierten Zellen keine stärkere Fluoreszenz-Aktivität als bei den Zellen, welche mit dem Antikörper IgG1 inkubiert worden waren. In der Immunphänotypisierung erwies sich die Zelloberfläche der Langerhans-Zellen somit als negativ bezüglich der Expression des Mannoserezeptors (Abb.4).

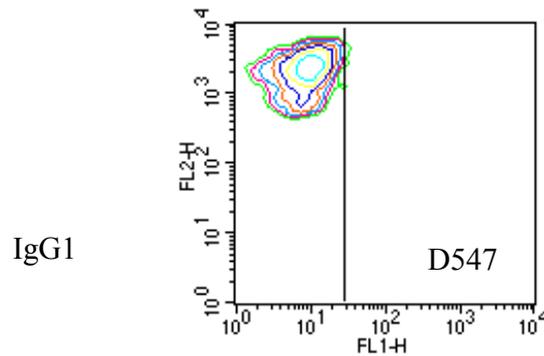


Abb.4 Immunphänotypisierung an Langerhans-Zellen aus gesunder Haut

Contour-Plots der für den Mannoserezeptor spezifischen Grünfluoreszenz (FL1), welche gegen die für CD1a spezifische Orange fluoreszenz (FL2) aufgetragen ist. Langerhanszellen aus normaler Haut zeigten nach Inkubation mit dem spezifischen Antikörper D547 keine größere Fluoreszenz-Aktivität als nach Inkubation mit dem Kontroll-Antikörper IgG1. Der Mannoserezeptor konnte mit der Immunphänotypisierung nicht auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden.

3.1.2.3 In der entzündeten Haut exprimieren die IDEC den Mannoserezeptor

In entzündlichen Hautläsionen treten Langerhans-Zellen und IDEC auf. Die Expression des Mannoserezeptors sollte bei diesen beiden Zelltypen wie auch bei den Proben aus der normalen Haut unter Verwendung des Antikörpers D547 untersucht werden. Als Negativkontrolle wurde der Antikörper IgG1 verwendet. Bei den Langerhans-Zellen, welche mit dem spezifischen Antikörper D547 inkubiert worden waren, konnte am Durchflußzytometer, wie auch in der normalen Haut, keine gesteigerte Fluoreszenz-Aktivität gegenüber den Zellen, welche mit dem Antikörper IgG1 inkubiert worden waren, festgestellt werden. Bei den IDEC zeigten diejenigen Zellen, welche mit dem Antikörper D547 inkubiert worden waren, eine deutliche Verstärkung der Fluoreszenz-Aktivität gegenüber den Zellen, welche mit dem Antikörper IgG1 inkubiert worden waren. Der Mannoserezeptor konnte also, wie bei den Untersuchungen an der normalen Haut, auf den Langerhans-Zellen unter Verwendung des spezifischen Antikörpers D547 nicht nachgewiesen werden. Bei den IDEC zeigte die deutliche Verstärkung der Fluoreszenz-Aktivität gegenüber der Negativkontrolle diesen Rezeptor auf der Zelloberfläche (Abb.5).

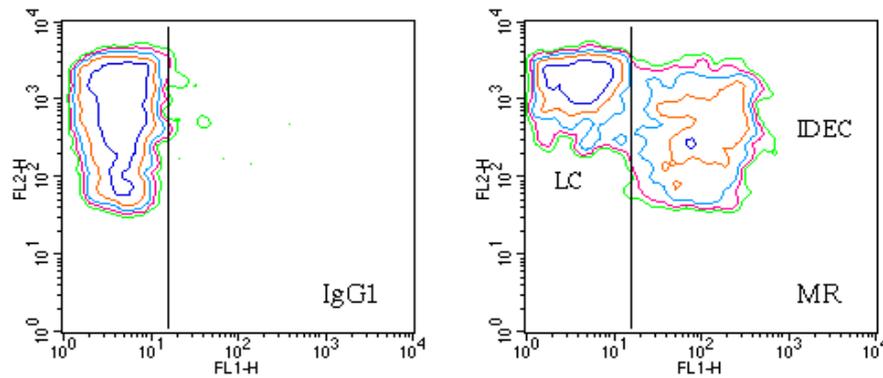


Abb.5 Immunphänotypisierung an Langerhans-Zellen und IDEC aus entzündeter Haut
 Immunphänotypisierung an Proben aus entzündlicher Haut. Contour-Plots der für den Mannoserezeptor spezifischen Grünfluoreszenz (FL1), welche gegen die für CD1a spezifische Orangefluoreszenz (FL2) aufgetragen ist. Die nahezu gleiche Position der Langerhans-Zellen zeigt keinen Unterschied in der Fluoreszenz-Intensität zwischen den Inkubationen mit den Antikörpern D547 und IgG1. Der Mannoserezeptor findet sich nicht auf Langerhans-Zellen aus entzündeter Haut. Bei der Inkubation der IDEC mit D547 eine deutlich stärkere Fluoreszenz als bei der Inkubation der Zellen mit dem Kontrollantikörper. Dieser Fluoreszenz-Unterschied legt die Expression des Mannoserezeptors auf den IDEC nahe.

1.1.1.1 Unterschiedlich starke Expression des Mannoserezeptors auf den IDEC bei verschiedenen Hauterkrankungen

Proben aus Hautläsionen bei atopischem Ekzem (n=5), bei Psoriasis vulgaris (n=8), bei allergischem Kontaktekzem (n=3) und anderen Hauterkrankungen (n=10) wurden untersucht. Aufgrund der geringen Probenanzahlen der jeweiligen Hautveränderungen können nur bedingt aussagekräftige Schlüsse über die Expression des Mannoserezeptors auf den IDEC bei allergischem Ekzem und bei Psoriasis vulgaris gezogen werden. Es zeigte sich eine etwas stärkere Ausprägung des Mannoserezeptors auf den IDEC bei allergischem Ekzem im Vergleich zur Expressionsstärke des Rezeptors auf den IDEC bei Psoriasis vulgaris. In der Abbildung 6 sind diese Unterschiede in einem Diagramm für Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen rFIs zu sehen.

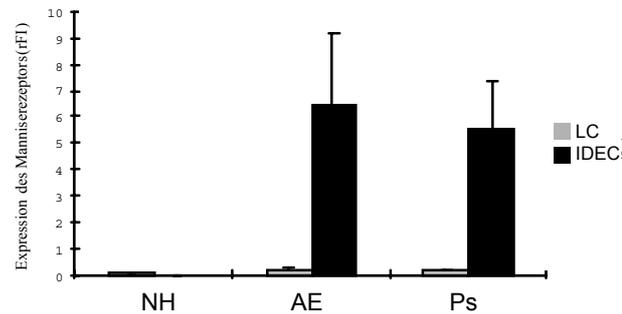


Abb.6 Säulendiagramm der Mannoserezeptor-Expression auf Langerhans-Zellen und IDEC

Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Fluoreszenz-Indices des Mannoserezeptors auf den IDEC bei allergischem Ekzem und Psoriasis vulgaris. Zum Vergleich rFIs für die Langerhans-Zellen der jeweiligen Hauterkrankungen sowie der normalen Haut.

3.2 Funktionelle Untersuchungen zur Endozytose

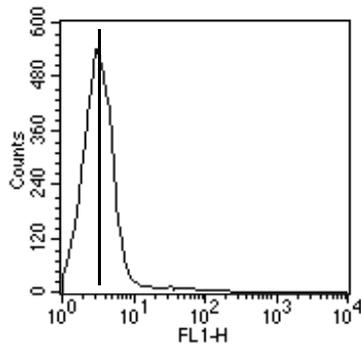
3.2.1 Funktionelle Untersuchungen an Monozyten und monozytären dendritischen Zellen

Die funktionellen Untersuchungen zur Endozytose wurden zunächst an Monozyten und MoDC's vorgenommen, um die Methoden zur Erfassung von Pinozytose, Rezeptor-vermittelter Endozytose und Phagozytose zu etablieren, als auch Positiv- und Negativkontrollen für die Untersuchungen an den Hautzellen zu erhalten.

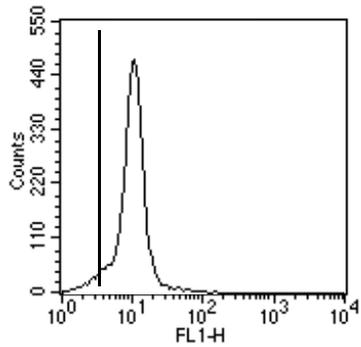
3.2.1.1 Pinozytose-Nachweis an Monozyten und monozytären dendritischen Zellen mit Lucifer Yellow

Die Pinozytose-Aktivität der Monozyten und der MoDC's wurde durch Färbung mit Lucifer Yellow von der Rezeptor-vermittelten Endozytose abgegrenzt. Sowohl bei den Monozyten, als auch bei den MoDC's zeigte sich eine Zunahme des mittleren Fluoreszenz-Index (rFI) im Verlauf der Inkubation im Wasserbad bei 37°C gegenüber der Kontrollprobe, die im Eiswasser belassen wurde. Der relative Fluoreszenz-Index stieg bei den Monozyten im Verlauf der Inkubation bis 30 Minuten mäßig an. Es fand

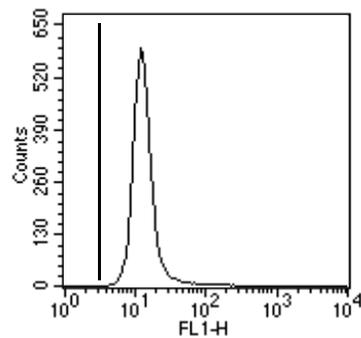
in Abhängigkeit von der Inkubationszeit eine geringe Aufnahme des Farbstoffes durch Pinozytose statt (Abb.7a und b).



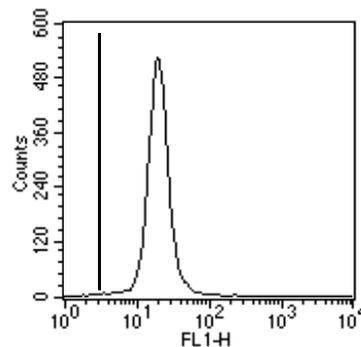
0 min.



3 min.



7 min.



30 min.

Abb.7a Histogramm der Lucifer-Yellow-Aufnahme durch Pinozytose bei den Monozyten

Fluoreszenz-Zunahme in Abhängigkeit von der Färbezeit. Die steigende Fluoreszenz ist durch die Aufnahme des Lucifer Yellow in die Zellen bedingt. Das erste Histogramm steht für die Kontrollprobe, welche im Eiswasserbad belassen wurde, die übrigen für die einzelnen Färbezeiten.

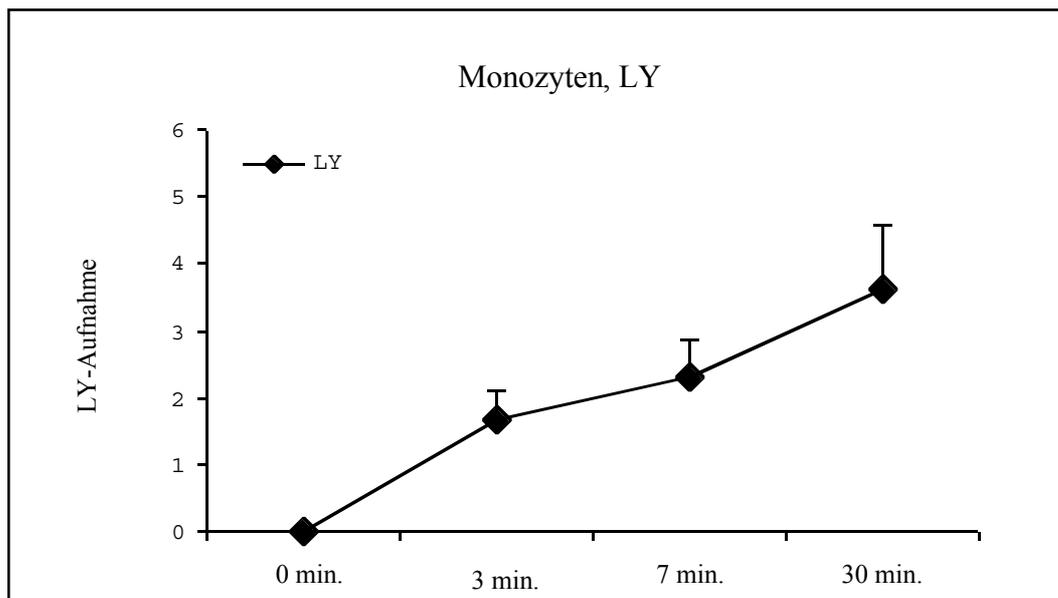
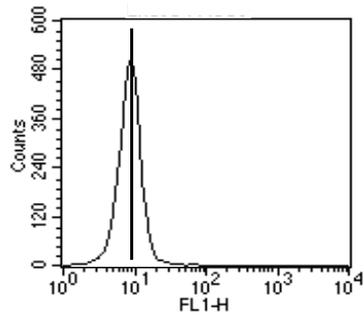


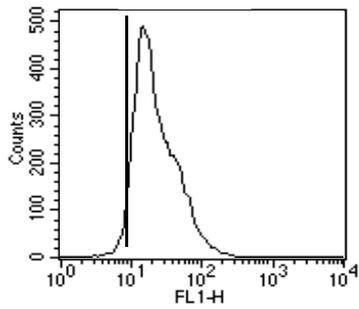
Abb.7b Mittelwerte und Standardabweichungen für die Pinozytose-Versuche bei Monozyten

Geringe Aufnahme von Lucifer Yellow in die Monozyten in Abhängigkeit von der Färbezeit. Mittelwerte der rFIs aller Versuche (n=6) und Standardabweichungen.

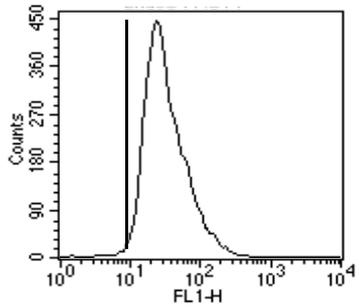
Bei den MoDC's stieg der relative Fluoreszenz-Index während der steigenden Inkubationszeiten mit Lucifer Yellow durchschnittlich im Vergleich zu den Monozyten stärker an. Die Aufnahme des Farbstoffes in die Zellen war bei den MoDC's stärker ausgeprägt als bei den Monozyten. Dabei nahmen die Zellen anfangs nur geringe Mengen des Farbstoffes in sich auf und steigerten die Endozytose-Aktivität mit zunehmender Färbezeit (Abb.8a und b).



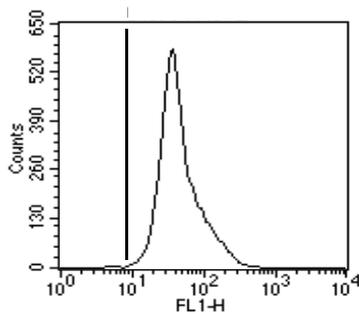
0 min.



3 min.



7 min.



30min.

Abb.8a Histogramm der Aufnahme von Lucifer Yellow mittels Pinozytose bei den MoDC's

Pinozytose-Fähigkeit der MoDC's in Abhängigkeit von der Zeit. Histogramme für die Kontrollprobe, welche im Eiswasser belassen wurde und die einzelnen Färbezeiten. Anstieg der Fluoreszenz-Intensität der MoDC's im Verlauf der Inkubation mit Lucifer Yellow.

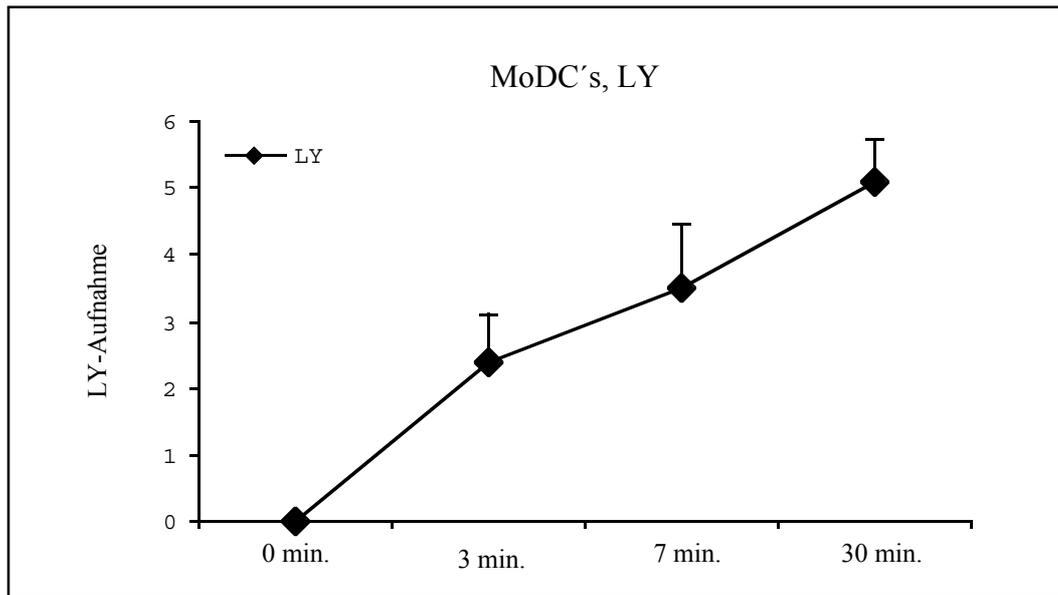


Abb.8b Mittelwerte und Standardabweichungen für die Pinozytose-Versuche bei MoDC's

Mittelwerte aller rFIs (n=6) und Standardabweichungen für alle Versuche zur Pinozytose-Aktivität der MoDC's mit Lucifer Yellow. In Abhängigkeit von der Färbezeit zeigt sich die Aufnahme des Lucifer Yellow in die Zellen durch Pinozytose.

3.2.1.2 Monozytäre dendritische Zellen nehmen über den Mannoserezeptor Dextran auf, Monozyten nicht

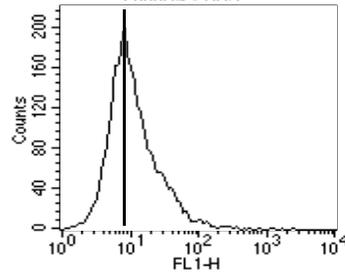
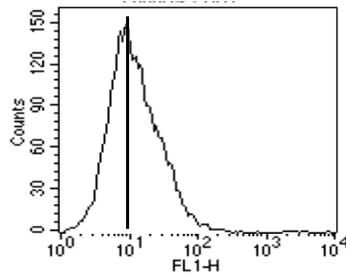
Der insgesamt geringe Anstieg des rFI bei Inkubation der Monozyten mit Dextran-FITC zeigt, daß bei den Monozyten keine relevante Rezeptor-vermittelte Endozytose stattfand. Der Farbstoff gelangte ausschließlich durch die stets stattfindende Pinozytose, welche bereits durch die Inkubation der Zellen mit Lucifer Yellow gezeigt worden war, in die Zellen. Das Ergebnis ist vereinbar mit demjenigen der Immunphänotypisierung, bei welcher der Mannoserezeptor auf den Monozyten nicht durch den spezifischen Antikörper D547 nachgewiesen werden konnte (Abb.9a und b).

Bei Inkubation der MoDC's mit Dextran-FITC zeigte sich im Verlauf der Zeitkinetik eine deutlich stärkere Fluoreszenz-Zunahme als bei den Monozyten. Dieser größere Fluoreszenz-Anstieg zeigt, daß nicht nur Pinozytose stattfand, sondern auch über die Rezeptor-vermittelte Endozytose Farbstoff in die Zellen aufgenommen wurde. Dieses Ergebnis steht mit demjenigen der Immunphänotypisierung in Einklang, in welcher

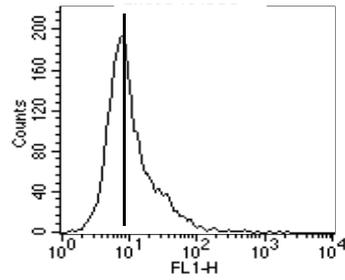
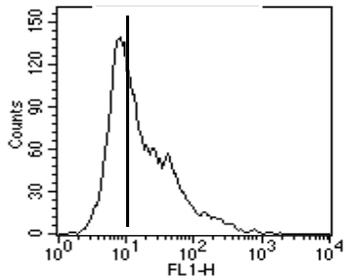
der Mannoserezeptor auf der Zelloberfläche eindeutig dargestellt worden war (Abb. 10a und b).

3.2.1.3 Der Mannoserezeptor ist nur auf den monozytären dendritischen Zellen hemmbar, Monozyten besitzen ihn nicht

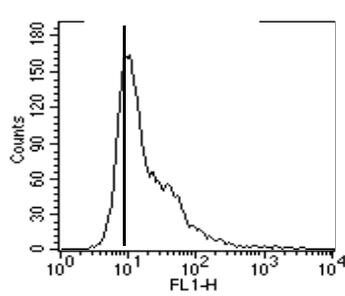
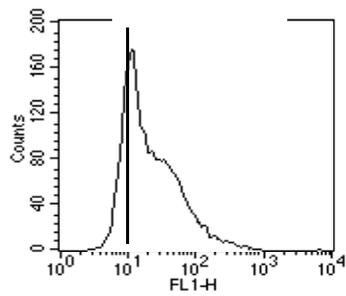
Bei den Monozyten war die Dextranaufnahme wie schon im vorangegangenen Versuch gering, sie ließ sich durch die Zugabe von Mannan nicht weiter verringern. Im Mann-Whitney-U-Test war der Unterschied in der Dextranaufnahme nicht signifikant, die Monozyten unterschieden sich demnach nicht in ihrer Endozytose-Aktivität ohne und mit Mannan. Die Aufnahme von wenig Farbstoff in die Monozyten, kombiniert mit der fehlenden Hemmbarkeit der Endozytose, untermauert das Ergebnis der Immunphänotypisierung, welches zeigt, daß auf den Monozyten der Mannoserezeptor nicht exprimiert wird und somit keine Rezeptor-vermittelte Endozytose möglich ist. Das in den Zellen nachgewiesene Dextran ist durch die stets stattfindende Pinozytose aufgenommen worden (Abb.9a und b). Wurde vor der Inkubation der MoDC's mit Dextran-FITC Mannan zu den Zellen hinzupipettiert, so zeigte sich eine deutlich geringere Aufnahme des Farbstoffes, als bei Dextraninkubation ohne vorausgehende Mannanzugabe. Der Unterschied zeigte sich vor allem bei fortschreitender Dauer der Inkubation. Im Mann-Whitney-U-Test ergab sich zwischen der alleinigen Inkubation mit Dextran-FITC und der Dextraninkubation mit vorheriger Mannanzugabe kein signifikanter Unterschied, für die beiden übrigen Färbezeiten zeigten sich signifikante Unterschiede in der Dextran-Ingestion ohne und mit Blockade des Mannoserezeptors mittels Mannan. Die Ergebnisse aus beiden Versuchen zeigen, daß MoDC's den Mannoserezeptor exprimieren und zur Dextranaufnahme benutzen, welche durch Mannan gehemmt werden kann. Da diese Hemmung nicht vollständig war und noch Dextran-FITC in die Zellen gelangte, stand den Zellen noch ein zusätzlicher rezeptorunabhängiger Mechanismus zur Aufnahme von Stoffen, die bei allen Zellen stets stattfindende Pinozytose, zur Verfügung (Abb.10a und b).



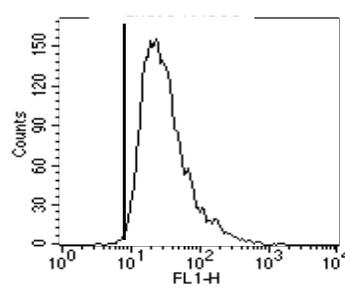
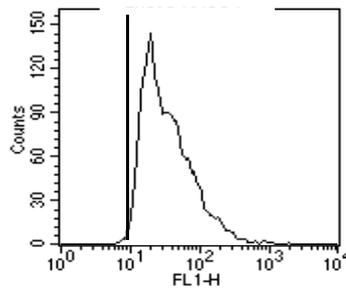
0 min.



3 min.



7 min.



30 min.

Dextran-FITC

Dextran-FITC + Mannan

Abb.9a Histogramm der Aufnahme von Dextran-FITC mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose und Hemmung der Dextran-Aufnahme durch Mannan bei Monozyten

Geringe Fluoreszenzzunahme im Verlauf des Versuches. Die Subtrataufnahme war mit und ohne vorangegangene Mannanzugabe nahezu gleich.

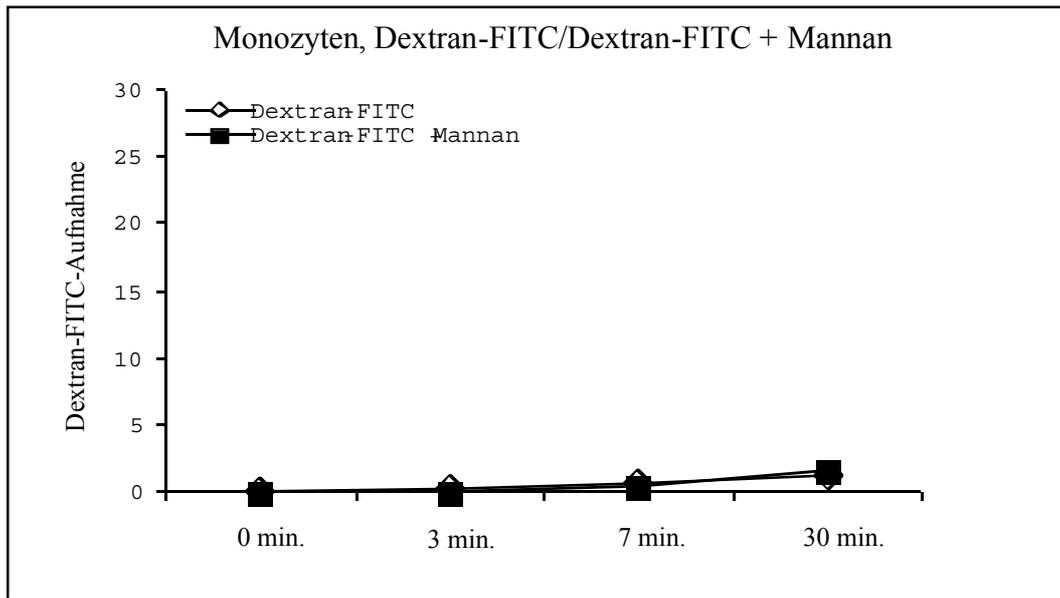


Abb.9b Mittelwerte und Standardabweichungen für die Versuche zur Rezeptor-vermittelten Endozytose bei Monozyten

Liniendiagramm, Mittelwerte der rFIs und Standardabweichungen (n=3), gezeigt ist die nur geringe Dextran-FITC-Aufnahme in die Monozyten durch Pinozytose. Wurde vor der Dextran-Inkubation Mannan zu den Zellen hinzupipettiert (n=3), so zeigte sich eine etwa gleiche Aufnahme von Dextran-FITC in die Zellen, welche durch Pinozytose erfolgte und nicht durch Mannan hemmbar war.

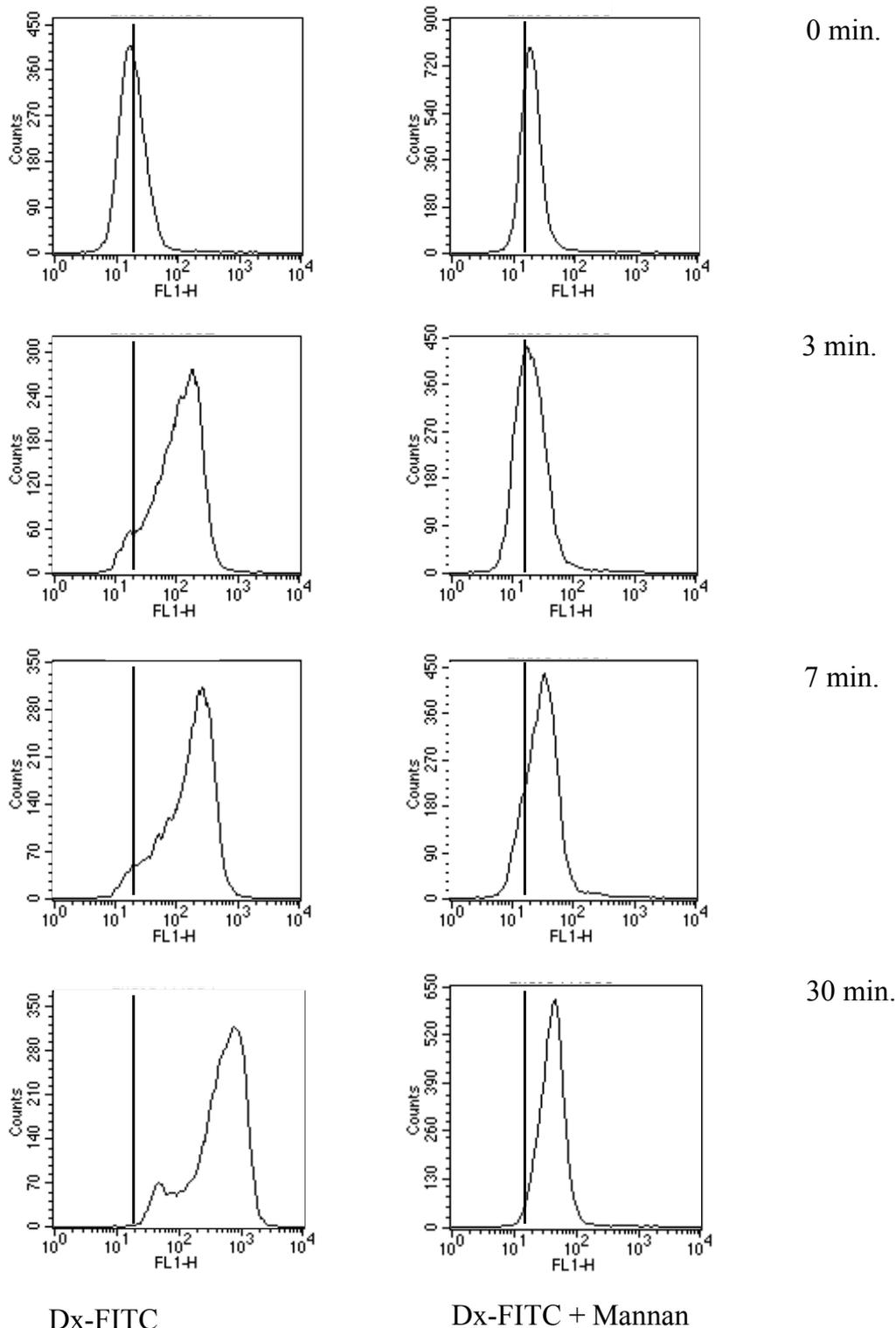


Abb.10a Darstellung der Aufnahme von Dextran-FITC mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose in die Zellen und Hemmung der Dextran-Aufnahme durch Mannan bei MoDC's

Anstieg der Fluoreszenz-Intensität während der Inkubation mit Dextran-FITC. Die MoDC's lassen eine starke Aufnahme des rezeptorspezifischen Farbstoffes durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in Abhängigkeit von der Färbezeit erkennen. Wurde vor der Inkubation mit Dextran-FITC Mannan zu den Proben gegeben, so nahmen die MoDC's deutlich geringere Mengen des Farbstoffes auf. Die durch den

Mannoserezeptor vermittelte Endozytose ließ sich durch die Blockierung des Rezeptors mit Mannan hemmen, geringe Farbstoffmengen wurden durch Pinozytose in die Zellen transportiert.

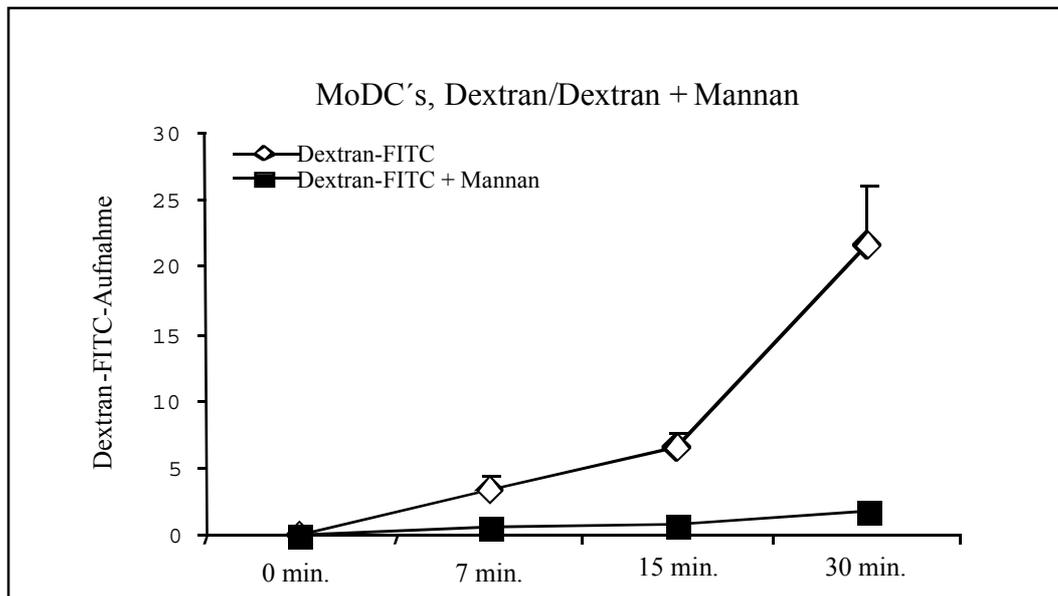
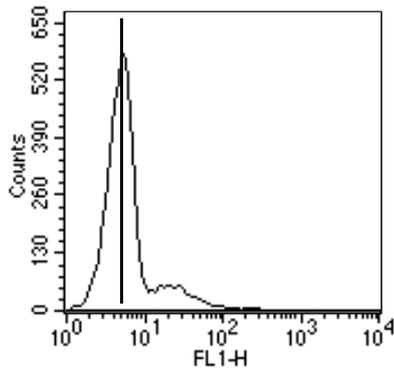


Abb.10b Mittelwerte und Standardabweichungen für die Versuche zur Rezeptor-medierten Endozytose bei MoDC's

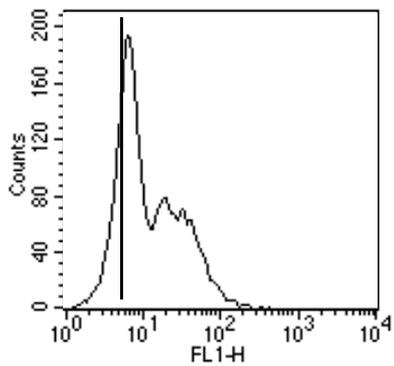
Mittelwerte der rFIs und Standardabweichungen (n=3) zur Rezeptor-vermittelten Endozytose mit Dextran-FITC an MoDC's und der Versuche der Rezeptor-Hemmung durch Mannan (n=3). Die deutliche Zunahme des rFIs läßt eine durch den Mannoserezeptor vermittelte Aufnahme des Farbstoffes in die Zellen erkennen. Die geringe Zunahme des rFI nach Inkubation der MoDC's mit Mannan vor der Dextranzugabe war durch Aufnahme des Dextrans mittels Pinozytose bedingt, die Rezeptor-vermittelte Endozytose war durch Mannan blockiert.

3.2.1.4 Monozyten phagozytieren E.coli, monozytäre dendritische Zellen nicht

Durch Inkubation der Monozyten und MoDC's mit einer Suspension von opsonisierten, FITC-markierten E.coli wurde die phagozytotische Aktivität der Zellen untersucht. Die Steigerung des rFI nach Inkubation läßt eine Aufnahme der E.coli in die Monozyten durch Phagozytose vermuten. In der Abbildung 11 wird die Zunahme der Fluoreszenz-Intensität dargestellt.



0 min.

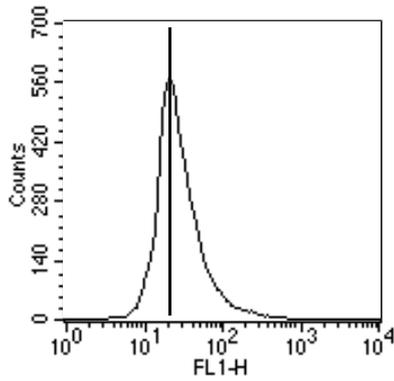


10 min.

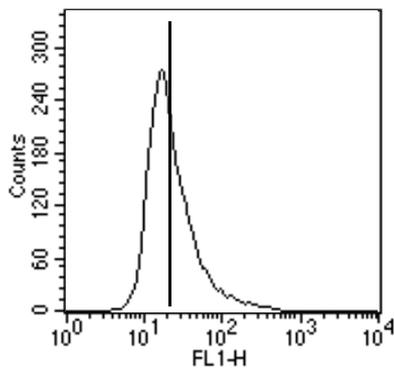
Abb.11 Histogramm der Phagozytose von opsonisierten E.coli bei den Monozyten

Monozyten wurden mit opsonisierten E.coli inkubiert. Der Anstieg der Fluoreszenz-Intensität nach zehn Minuten Inkubation der Zellen mit E.coli gegenüber der Kontrollprobe auf Eis zeigt die Aufnahme der Bakterien in die Zellen an.

Bei den MoDC's konnte kein Anstieg der Fluoreszenz-Aktivität gegenüber der im Eiswasserbad belassenen Kontrollprobe beobachtet werden (n=3). Die MoDC's zeigten somit keine Phagozytose der E.coli (Abb.12).



0 min.



10 min.

Abb.12 Histogramm der Phagozytose von opsonisierten E.coli bei den MoDC's
Keine Steigerung der Fluoreszenz-Intensität nach Inkubation der MoDC's mit E.coli gegenüber der Kontrolle. Es wurden keine Bakterien in die Zellen aufgenommen.

3.2.2 Funktionelle Untersuchungen an Langerhans-Zellen und IDEC

Die funktionellen Untersuchungen an den Langerhans-Zellen und den IDEC wurden analog zu den Versuchen an den Monozyten und den MoDC's durchgeführt. Dabei wurden sowohl Proben aus normaler Haut, wie auch Biopsien aus entzündlicher Haut den Experimenten zugeführt.

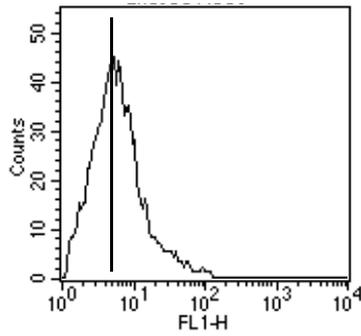
3.2.2.1 Dendritische Hautzellen nehmen Lucifer Yellow über Pinozytose auf

Es wurde die Pinozytose der Langerhans-Zellen und der IDEC unter Verwendung von Lucifer Yellow untersucht. Bei den Langerhans-Zellen aus normaler Haut zeigte sich eine kontinuierliche Zunahme der Fluoreszenz im Verlauf der Inkubation im Wasserbad bei 37°C gegenüber der Kontrollprobe, welche im Eiswasser bei 4°C belassen wurde. Es konnte somit eine Aufnahme des rezeptorunabhängigen

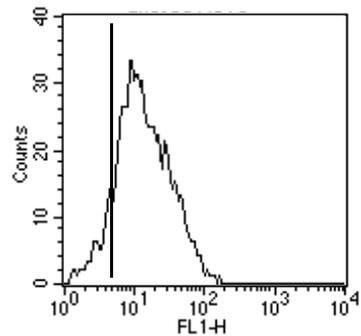
Farbstoffes Lucifer Yellow in die Zellen beobachtet werden, welche über Pinozytose erfolgte (Abb.13).

Bei den Langerhans-Zellen aus entzündlichen Hautläsionen stieg die Fluoreszenz mit steigenden Inkubationszeiten geringgradig stärker als bei den Langerhans-Zellen aus der gesunden Haut an. Demnach konnte auch bei den Zellen aus der entzündlichen Haut die Pinozytose mit dem rezeptorunabhängigen Farbstoff Lucifer Yellow nachgewiesen werden (Abb.14).

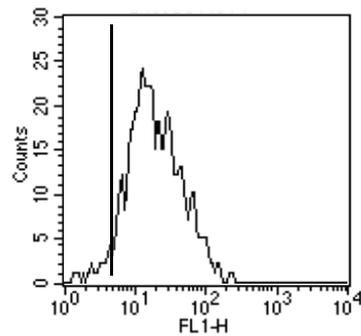
Bei den IDEC war eine kontinuierliche Zunahme der relativen Fluoreszenz-Intensität im Verlauf der Inkubation im Wasserbad bei 37°C gegenüber der Kontrollprobe, welche im Eiswasserbad belassen wurde, zu verzeichnen. Es konnte somit bei diesen Zellen eine Pinozytose-Aktivität mit dem rezeptorunabhängigen Farbstoff Lucifer Yellow gezeigt werden (Abb.15).



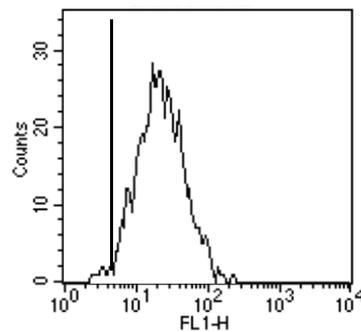
0 min.



3 min.



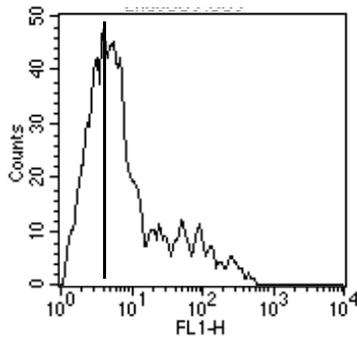
7 min.



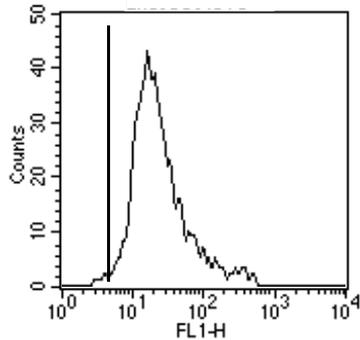
30 min.

Abb.13a Histogramm der Lucifer-Yellow-Aufnahme durch Pinozytose in die Langerhans-Zellen aus gesunder Haut

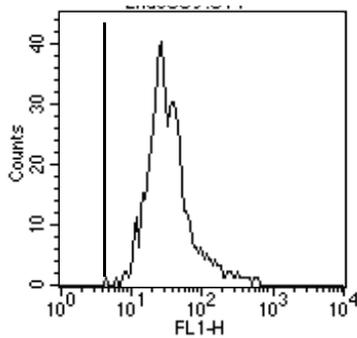
Langerhans-Zellen aus der normalen Haut wurden mit Lucifer Yellow in einer Zeitkinetik inkubiert. Die Aufnahme von Lucifer Yellow in die Langerhans-Zellen aus normaler Haut durch Pinozytose zeigt sich durch die Zunahme der Fluoreszenz-Intensität während der Inkubation und die damit verbundene Verlagerung der Kurve nach rechts.



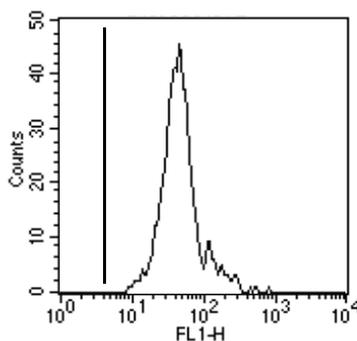
0 min.



3 min.



7 min.



30 min.

Abb.14a Histogramm der Aufnahme von Lucifer Yellow durch Pinozytose in die Langerhans-Zellen aus entzündeter Haut

Aufnahme von Lucifer Yellow durch Pinozytose in die Langerhans-Zellen aus entzündlich veränderter Haut dargestellt. Mit zunehmender Färbezeit steigt die Menge des Lucifer Yellow in den Zellen an, dadurch nimmt die Fluoreszenz zu (Wanderung der Kurve nach rechts).

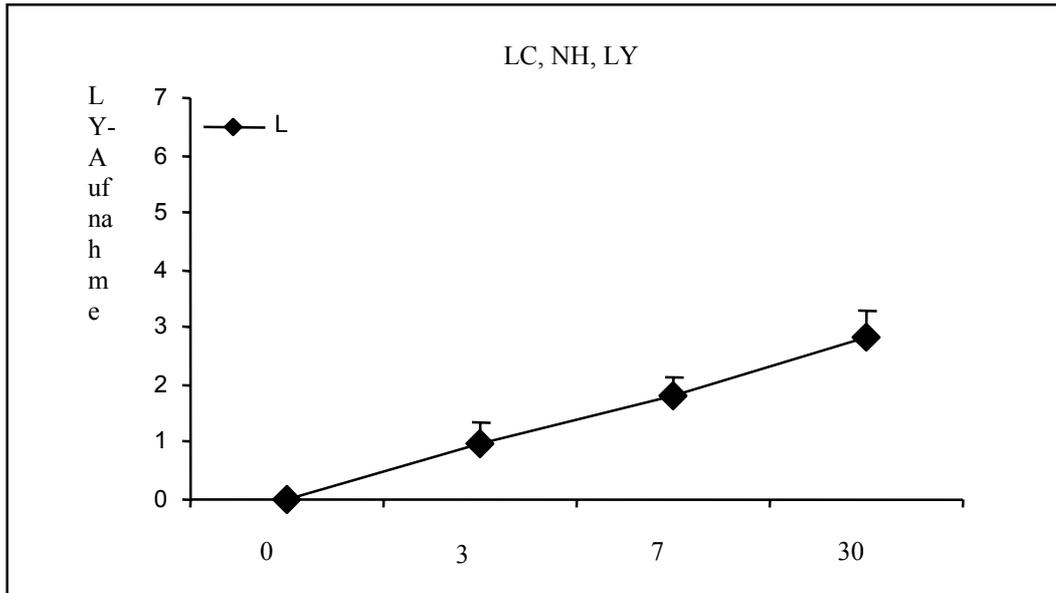


Abb.13b Pinozytose-Versuche bei Langerhans-Zellen aus der normalen Haut
 Pinozytose-Nachweis an den Langerhans-Zellen aus der normalen Haut (Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3)).

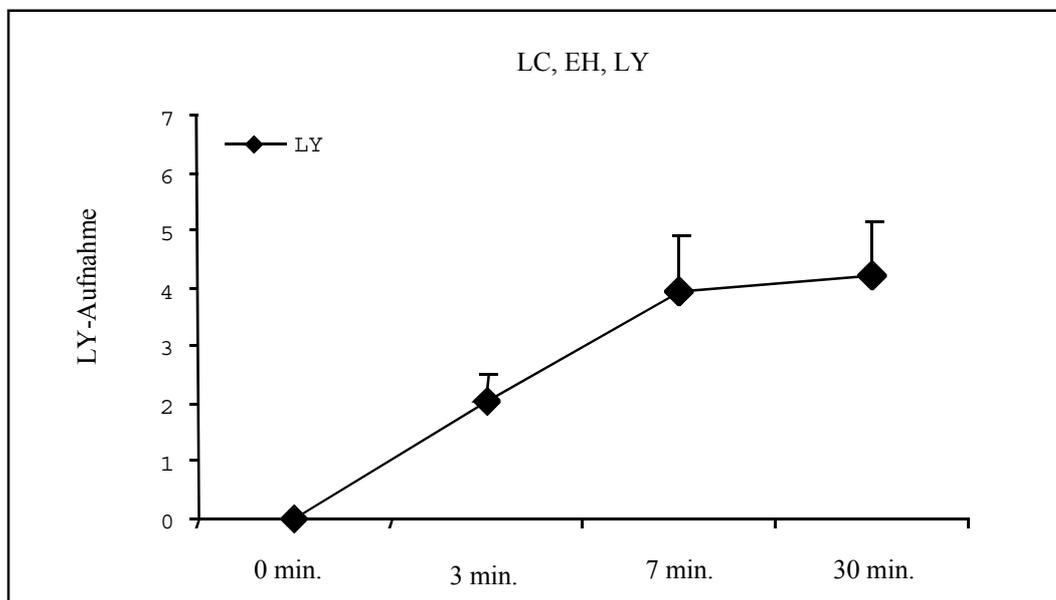
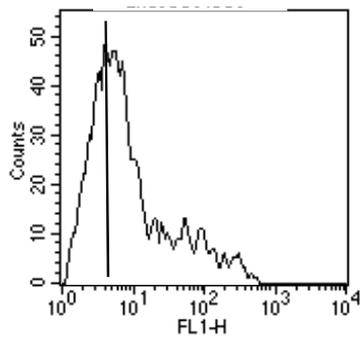
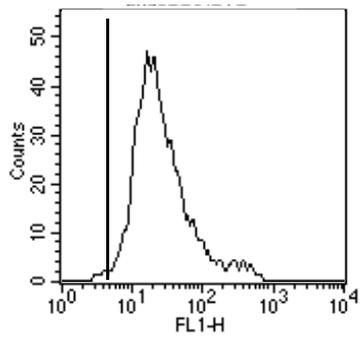


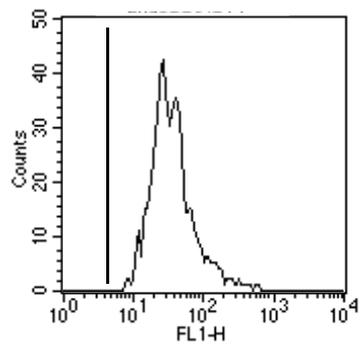
Abb.14b Pinozytose-Versuche an Langerhans-Zellen aus entzündeter Haut
 Pinozytose-Versuche an Langerhans-Zellen aus entzündlichen Hautläsionen (Mittelwerte aller rFIs und Standardabweichungen(n=8)).



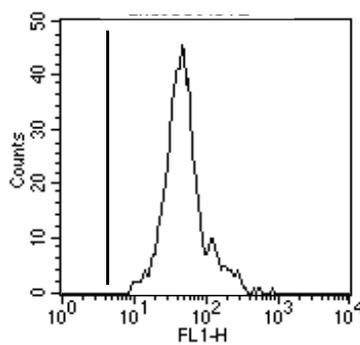
0 min.



3 min.



7 min.



30 min.

Abb.15a Histogramm der Lucifer Yellow-Aufnahme mittels Pinozytose in die IDEC

Aufnahme von Lucifer Yellow durch Pinozytose bei den IDEC, Steigerung der Fluoreszenz-Intensität mit zunehmender Inkubationszeit.

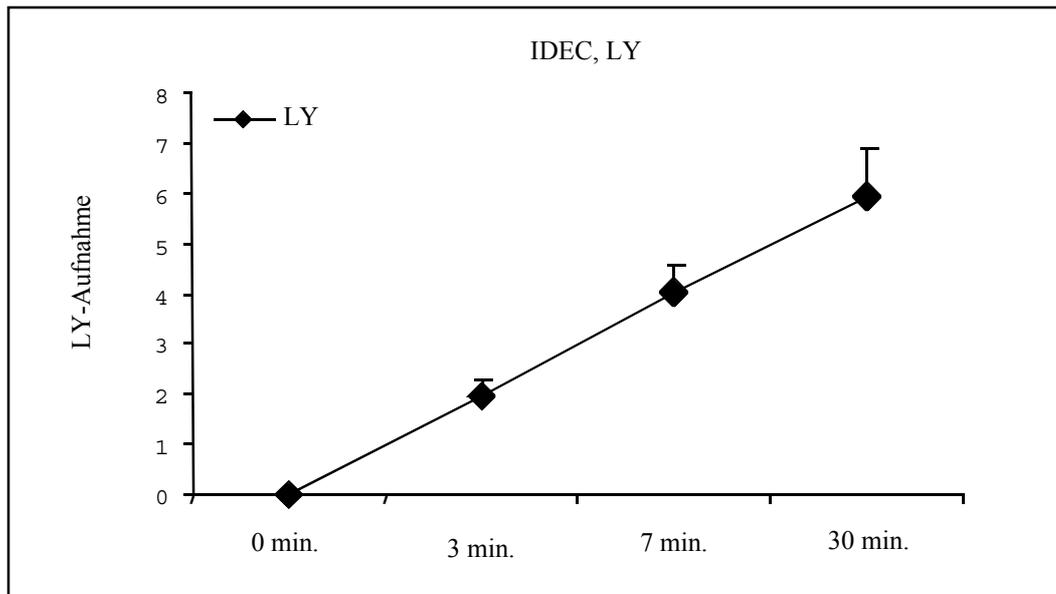


Abb.15b Pinozytose-Versuche bei IDEC mit Lucifer Yellow in Abhängigkeit von der jeweiligen Inkubationszeit

Mittelwerte aus den rFIs sowie Standardabweichungen (n=11).

Die Langerhans-Zellen aus normaler und entzündlicher Haut unterschieden sich kaum in ihrer Pinozytose-Aktivität welche insgesamt gering war, während die IDEC eine stärkere Pinozytose-Fähigkeit besaßen.

3.2.2.2 Nur IDEC besitzen die Fähigkeit zu Rezeptor-vermittelter Endozytose

Durch Inkubation der Zellen mit Dextran-FITC wurde untersucht, ob die Langerhans-Zellen und die IDEC, falls sie den Mannoserezeptor auf ihrer Oberfläche tragen, diesen zur Rezeptor-vermittelten Endozytose benutzen können. Wie bei den Monozyten, welche im folgenden Versuch als Negativkontrolle verwendet wurden und den MoDC's, welche hier als Positivkontrolle dienten, wurde die Aufnahme des Farbstoffes in die Zellen in Abhängigkeit von der Färbezeit quantitativ bestimmt. Bei den Langerhans-Zellen aus der gesunden Haut konnte ein Anstieg der Fluoreszenz beobachtet werden. Allerdings kann bei alleiniger Dextran-FITC-Inkubation nicht bestimmt werden, über welchen Endozytose-Mechanismus das Dextran in die Zellen einverleibt wird (Abb.16a und b).

Bei den Langerhans-Zellen aus der entzündlichen Haut ergab sich eine etwas geringere Steigerung der Fluoreszenz-Aktivität, als bei den Langerhans-Zellen aus gesunder Haut. Wiederum kann bei alleiniger Dextran-FITC-Inkubation keine Aussage über den Endozytose-Mechanismus gemacht werden, da die stets stattfindende Pinozytose nicht eindeutig bestimmt werden kann (Abb.17a und b).

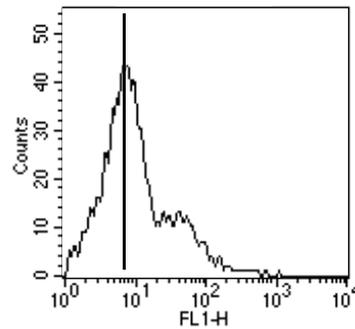
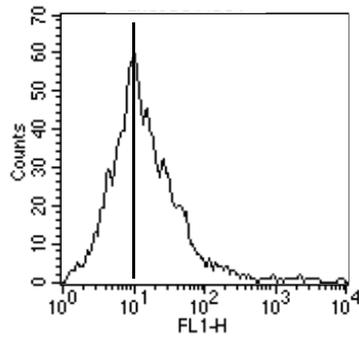
Die IDEC ließen nach 30 Minuten Inkubationszeit einen Anstieg der relativen Fluoreszenz-Intensität im Vergleich zur Kontrollprobe erkennen. Es gelangt somit Farbstoff in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in die Zellen. Auch hier kann durch die alleinige Gabe eines receptorspezifischen Stoffes nicht zwischen den Anteilen von Pinozytose und Rezeptor-vermittelter Endozytose unterschieden werden (Abb.17a und b).

3.2.2.3 Der Mannoserezeptor kann auf den IDEC durch Mannan gehemmt werden

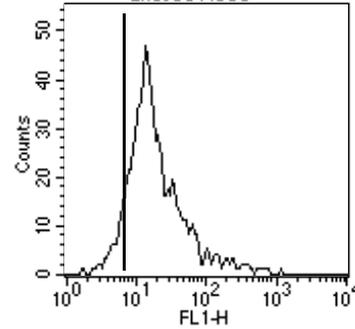
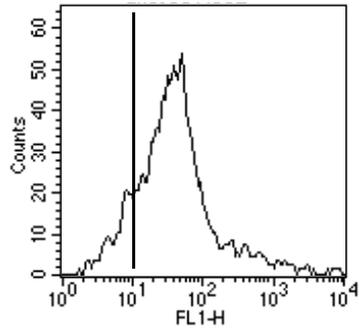
Analog zu den Monozyten und den MoDC's wurden auch die Hautzellen vor der Zugabe von Dextran-FITC mit Mannan inkubiert. Da Mannan an den Mannoserezeptor bindet, wird dieser blockiert und steht somit nicht mehr für die Endozytose zur Verfügung. Diejenige Menge an Farbstoff, die nach dieser Blockierung des Rezeptors in die Zellen aufgenommen wird, ist somit nicht durch Rezeptor-vermittelte Endozytose, sondern durch einen rezeptorunabhängigen Endozytosemechanismus, der bei allen Zellen stets stattfindenden Pinozytose bedingt. Zudem kann neben der Abgrenzung der Endozytosewege voneinander, bestimmt werden, welche Zellen überhaupt einen Mannoserezeptor exprimieren.

Die Langerhans-Zellen aus normaler und entzündlicher Haut nahmen in Verlauf der Inkubation nach Mannan-Zugabe zunächst weniger Dextran-FITC in sich auf, als bei Inkubation ohne vorangehende Mannan-Zugabe. Nach 30 Minuten war die in den Zellen befindliche Farbstoffmenge bei Inkubation ohne und mit Mannan nahezu gleich. Es konnte somit keine Hemmung der Farbstoffaufnahme durch das für den Mannoserezeptor spezifische Mannan erreicht werden, dies zeigt, daß keine Rezeptor-vermittelte Endozytose stattfand, sondern das Dextran allein durch Pinozytose von den Langerhans-Zellen aufgenommen wurde (kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Inkubationsarten in der statistischen Auswertung). Das Ergebnis Inkubation mit Dextran-FITC ohne und mit vorausgegangener

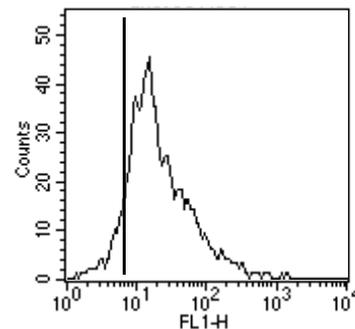
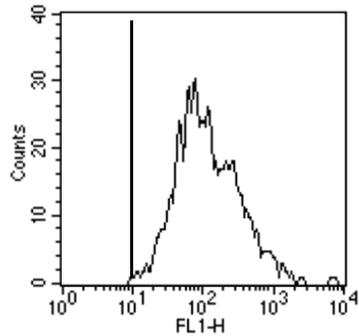
Mannaninkubation steht demnach mit demjenigen der Immunphänotypisierung in Einklang, bei welcher der Mannoserezeptor auf den Langerhans-Zellen nicht gefunden werden konnte (Abb.16a und b).



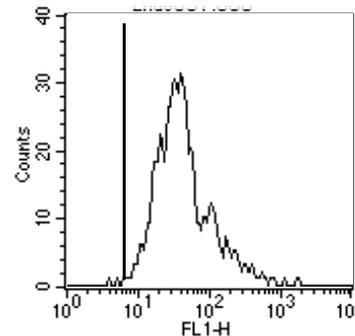
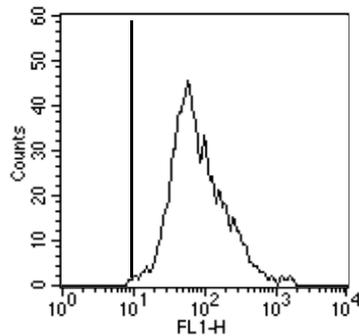
0 min.



3 min.



7min.



30 min.

Dextran-FITC

Dextran-FITC + Mannan

Abb.16a Histogramm der Dextranaufnahme ohne und mit vorangegangener Mannaninkubation

Bei Langerhans-Zellen aus normaler Haut kann sowohl ohne als auch mit vorangehender Inkubation mit Mannan ein Anstieg der Fluoreszenz-Aktivität während der Färbung der Zellen mit Dextran-FITC festgestellt werden. Es fand unabhängig von der Verwendung von Mannan eine Aufnahme des Farbstoffes in die Zellen statt. Die nahezu gleiche Fluoreszenz-Intensität bei beiden Versuchen und die

fehlende Hemmbarkeit zeigen, die Langerhans-Zellen nur durch Pinozytose Stoffe in sich aufnehmen können.

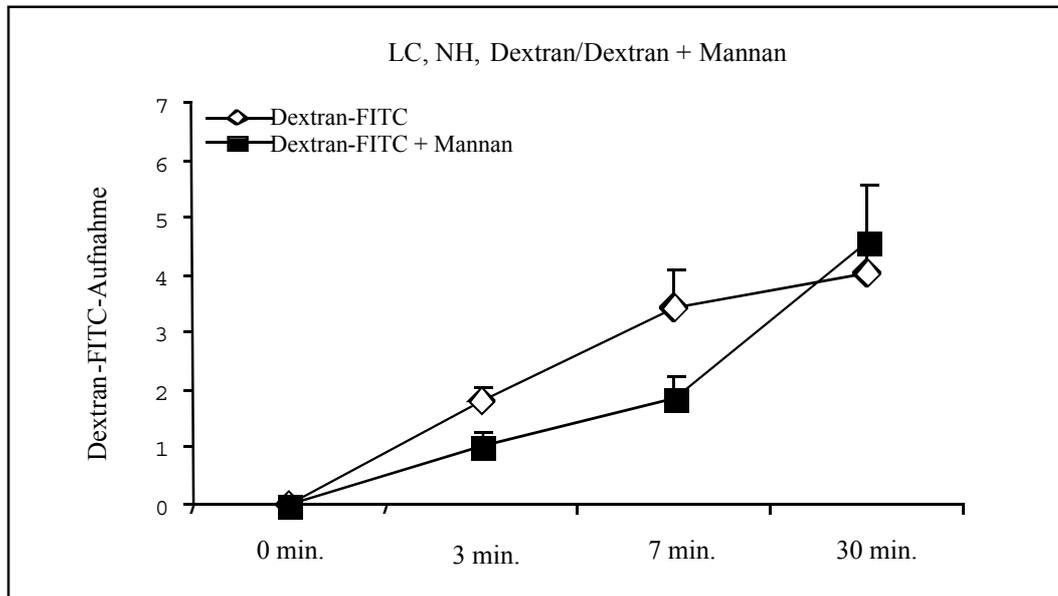
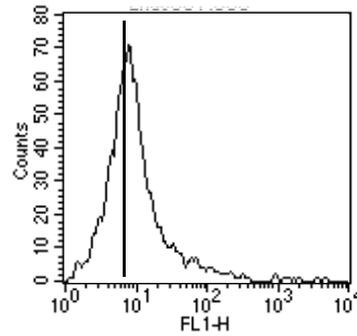
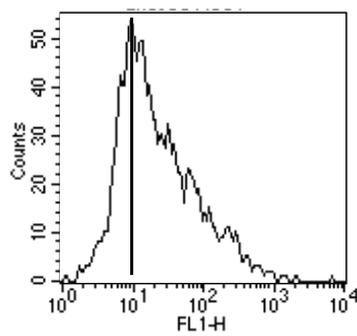


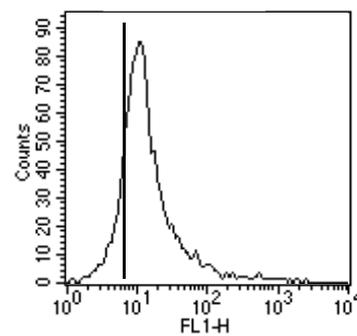
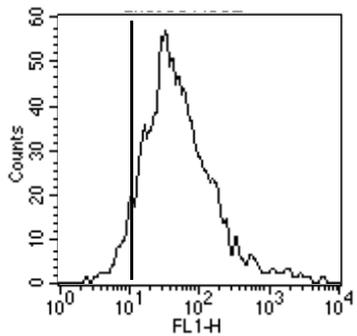
Abb.16b Rezeptor-vermittelte Endozytose bei Langerhans-Zellen aus normaler Haut

Mittelwerte der rFIs und Standardabweichungen zur Rezeptor-vermittelten Endozytose mit Dextran-FITC in Anwesenheit (n=8) und Abwesenheit von Mannan (n=6). Eine Hemmung der Dextranaufnahme in die Zellen durch Mannan ist nicht zu erkennen.

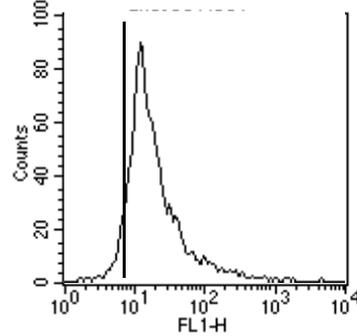
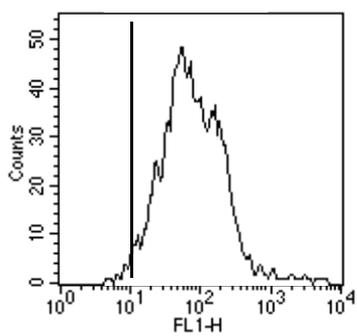
Die Langerhans-Zellen, welche aus entzündlicher Haut isoliert worden waren, wiesen ähnliche Ergebnisse, wie diejenigen aus normaler Haut, auf. Die Intensität der Fluoreszenz-Steigerung bei Dextraninkubation der Zellen war unabhängig von einer vorangegangenen Inkubation der Zellen mit Mannan nahezu gleich (kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Inkubationsarten in der statistischen Auswertung). Wie auch bei den Langerhans-Zellen aus gesunder Haut läßt dies darauf schließen, daß nur Pinozytose und keine Rezeptor-vermittelte Endozytose stattfand (Abb.17a und b).



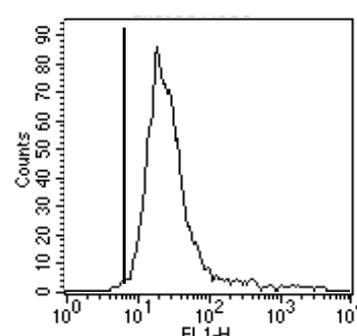
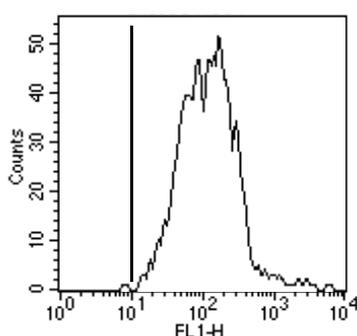
0 min.



3 min.



7 min.



30 min.

Dextran-FITC

Dextran-FITC + Mannan

Abb.17a Histogramm der Dextran-FITC-Aufnahme in die Langerhans-Zellen aus entzündlicher Haut, ohne und mit vorangegangener Inkubation der Zellen mit Mannan

Sowohl mit als auch ohne vorherige Mannaninkubation ein nahezu gleicher Anstieg der Fluoreszenz-Aktivität. Die Aufnahme des Farbstoffes in die Zellen konnte demnach nicht durch Mannan gehemmt werden, sie ist durch die rezeptorunabhängige Pinozytose bedingt.

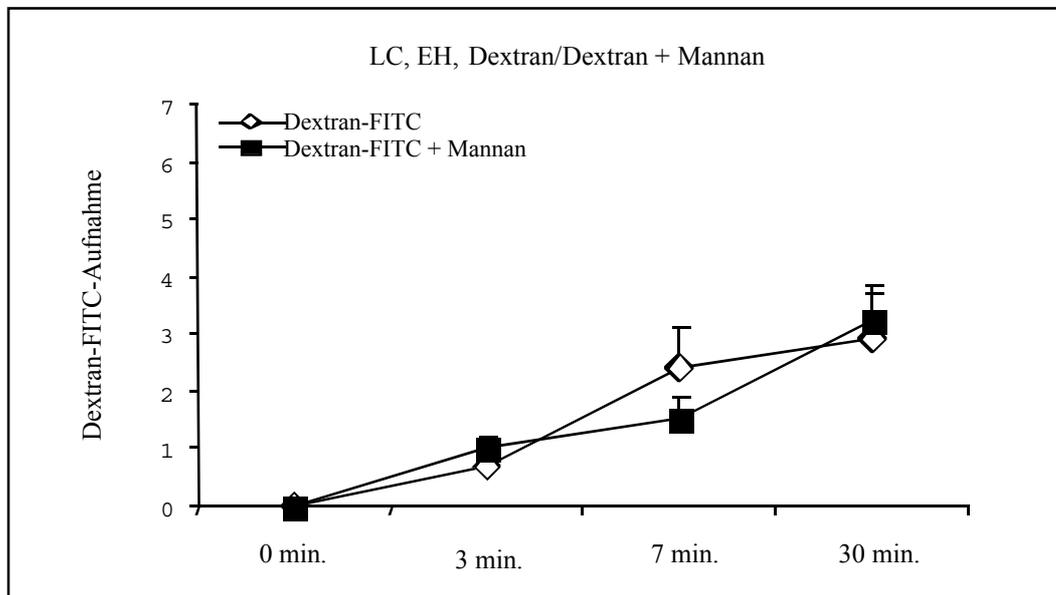
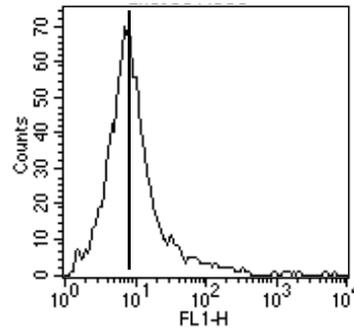
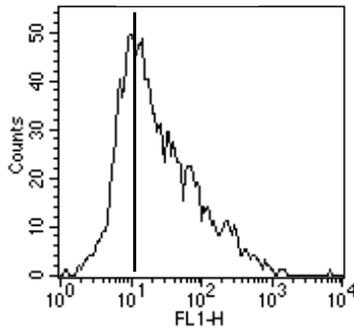


Abb.17b Rezeptor-medierte Endozytose bei Langerhans-Zellen aus entzündlicher Haut

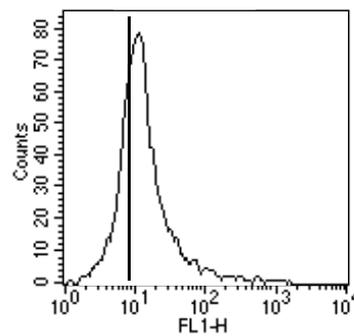
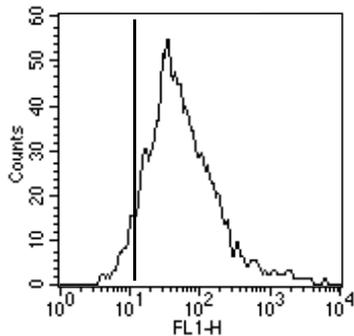
Mittelwerte aller rFIs und alle Standardabweichungen (n=3) zur Hemmung der durch den Mannoserezeptor vermittelten Endozytose unter Verwendung von Mannan (n=3) für Langerhans-Zellen. Die von der Inkubationszeit abhängige Dextranaufnahme kann nicht durch Mannan gehemmt werden.

Bei den IDEC zeigte sich im Vergleich zum vorausgegangenen Versuch ohne Mannanzugabe zu den Zellen, nach der Inkubation mit Mannan eine deutlich geringere Aufnahme von Dextran-FITC in die Zellen. Die Endozytose konnte somit durch den für den Mannoserezeptor spezifischen Liganden Mannan gehemmt werden. Durch die Blockierung des Mannose-Rezeptors konnte Dextran nur noch mittels Pinozytose in die Zellen aufgenommen werden. In der statistischen Auswertung zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Ingestion des Dextran-FITC ohne und mit vorausgegangene Mannaninkubation bei sieben Minuten Inkubation. Ein deutlicher Unterschied in der Absorption des Dextran war demnach nur bei sieben Minuten Färbezeit zu sehen. Das Ergebnis der funktionellen Untersuchungen mit Dextran-FITC und Mannan bestätigt somit dasjenige der Immunphänotypisierung, in

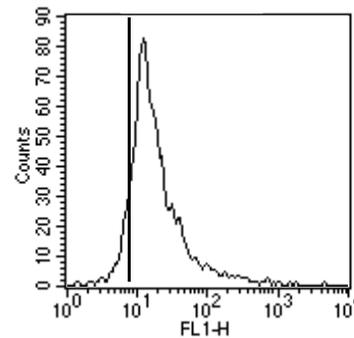
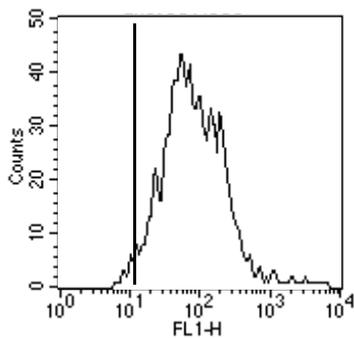
welcher der Mannoserezeptor auf den IDEC durch den spezifischen Antikörper D547 nachgewiesen werden konnte. Es zeigt auch den Unterschied der IDEC zu den Langerhans-Zellen, welche keinen Mannoserezeptor besitzen und nicht zur Rezeptor-vermittelten Endozytose befähigt sind, sondern lediglich durch Pinozytose Stoffe aus dem sie umgebenden Medium inkorporieren können (Abb.18a und b).



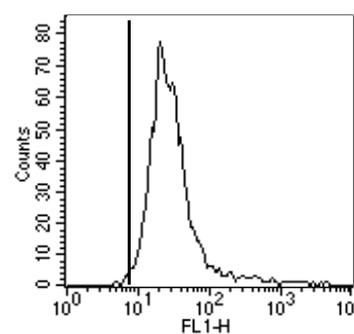
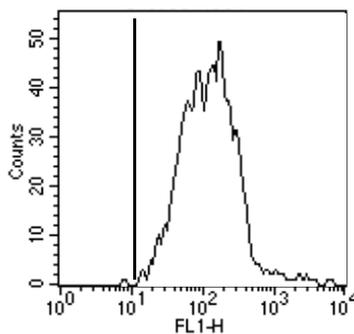
0 min.



3 min.



7 min.



30 min.

Dextran-FITC

Dextran-FITC + Mannan

Abb.18a Dextran-FITC-Aufnahme ohne und mit vorausgegangener Inkubation der Zellen mit Mannan bei den IDEC

Verminderung der Dextranaufnahme durch Blockierung des Mannoserezeptors mittels Mannan an den IDEC. Die Steigerung der Fluoreszenz-Intensität bei Inkubation der Zellen mit Dextran-FITC ist nach der Zugabe von Mannan geringer, als ohne vorangegangene Mannaninkubation.

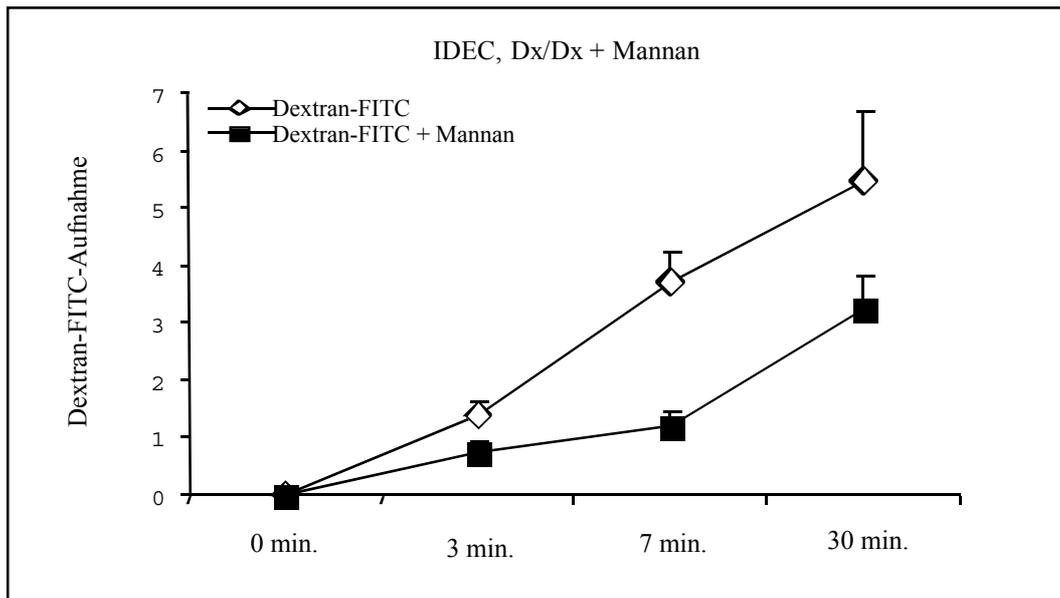
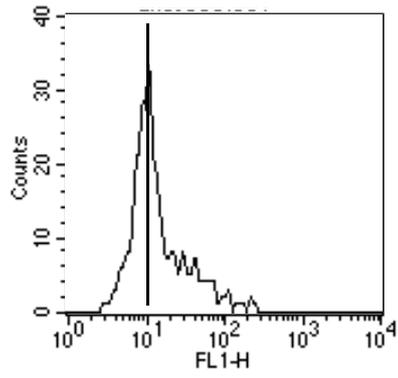


Abb.18b Rezeptor-vermittelte Endozytose bei den IDEC

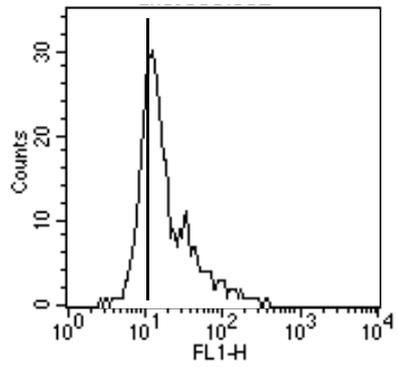
Die Mittelwerte der rFIs und alle Standardabweichungen. Unter Verwendung von Mannan ließ sich eine geringere Dextranaufnahme in die Zellen feststellen, als ohne die Inkubation mit Mannan.

3.2.2.4 Dendritische Zellen der Haut können keine E.coli phagozytieren

Unter Verwendung von opsonisierten, FITC-markierten E.coli sollte die phagozytotische Aktivität der Langerhans-Zellen und der IDEC wie vorher an den Monozyten, welche als Positivkontrolle dienen und den MoDC's, hier als Negativkontrolle eingesetzt, untersucht werden. Es wurden nur Proben aus entzündlichen Hautläsionen für das Experiment verwendet. Bei den Langerhans-Zellen zeigte sich nach 10 Minuten Inkubation mit E.coli keine Steigerung der Fluoreszenz-Intensität und damit keine Phagozytose der Bakterien (Abb.19). Bei den IDEC konnte ebenfalls ein nur unwesentlicher Anstieg der Fluoreszenz-Aktivität festgestellt werden. Somit phagozytierten auch die IDEC keine E.coli (Abb.20).

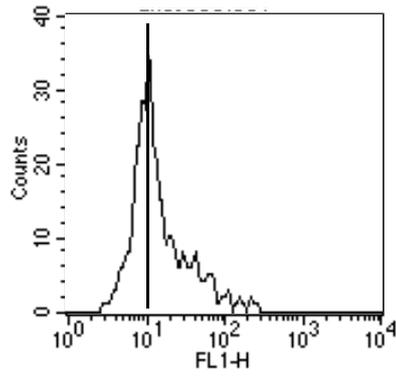


0 min.

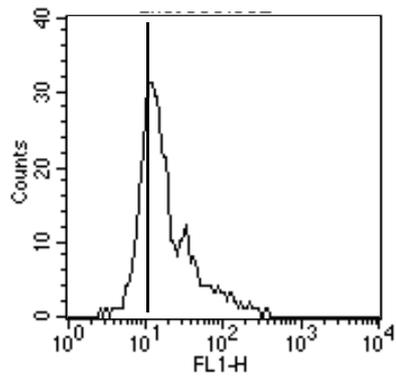


10 min.

Abb.19 Fehlende Phagozytose-Aktivität bei den Langerhans-Zellen aus entzündeter Haut



0 min.



10 min.

Abb.20 Fehlende Phagozytose-Aktivität bei den IDEC

Nahezu gleiche Fluoreszenz-Intensitäten für IDEC im Kontrollröhrchen auf Eis und für mit E.coli für 10 Minuten inkubierte IDEC, die E.coli wurden demnach nicht durch Phagozytose in die Zellen aufgenommen (n=3).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß Monozyten keinen Mannoserezeptor auf ihrer Zelloberfläche exprimieren und nicht zu Rezeptor-vermittelter Endozytose von Dextran-FITC fähig sind. Ihre Fähigkeit zur Phagozytose konnte nachgewiesen werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die MoDC's den Mannoserezeptor besitzen und ihn auch zur Endozytose benutzen. Durch die Anfärbung der histologischen Hautschnitte und durch die Immunphänotypisierung konnte nachgewiesen werden, daß Langerhans-Zellen weder in der gesunden, noch in der entzündlichen Haut den Mannoserezeptor exprimieren. Dieses Ergebnis konnte durch die funktionellen Versuche untermauert werden, bei welchen die Langerhans-Zellen keine hemmbare Rezeptor-vermittelte Endozytose aufwiesen. Es konnte die Expression des Mannoserezeptors auf den nur in der entzündlichen Haut vorkommenden IDEC durch die APAAP-Färbung und die Immunphänotypisierung mit dem spezifischen Antikörper D547 nachgewiesen werden. Die Fähigkeit zur Rezeptor-vermittelten Endozytose und deren Hemmbarkeit zeigen ebenfalls das Vorhandensein und die Funktionsfähigkeit des Mannoserezeptors bei den IDEC an. Es konnte somit weiter untermauert werden, daß IDEC eine eigenständige Population dendritischer Zellen sind und sie sich in ihren Fähigkeiten in einer weiteren Eigenschaft von den Langerhans-Zellen unterscheiden. Durch Inkubation der Zellen aus der normalen sowie der entzündlichen Haut mit opsonisierten E.coli konnte gezeigt werden, daß weder die Langerhans-Zellen noch die IDEC phagozytieren können.

4.1 Vorkommen und Funktion des Mannoserezeptors

Die Expression, die Funktion (Sallusto et al., 1995, Tan et al., 1997, Engering et al., 1997) und die Regulation (Allavena et al., 1998, Longoni et al., 1998) des Mannoserezeptors wurde bereits auf vielen Zellarten, wie Monozyten und Makrophagen (Noorman et al., 1997), unreifen und reifen MoDC's (Sallusto et al., 1995, Tan et al., 1997, Noorman et al., 1997) und dendritischen Zellen der Lunge (Cochand et al., 1999) untersucht. Versuche wurden auch an Zellen aus der Haut, dem Knochenmark, dem Thymus, Lymphknoten und dem Blut unternommen. Langerhans-Zellen wurden in situ oder aus dem Zellverband isoliert untersucht (Condaminet et al., 1998,

Mommaas et al., 1999). Der Mannoserezeptor vermittelt die Endozytose von an ihn gebundenen Antigenen in kleinen von Clathrin umhüllten Vesikeln. Er gilt als Erkennungsmerkmal für unreife dendritische Zellen, insbesondere für MoDC's (Bell et al., 1999). Dendritische Zellen aus entzündlich veränderter Haut wurden bislang nicht untersucht. Die Erforschung des Rezeptors in entzündlich veränderter Haut ist nicht einfach, da aus ethischen und technischen Gründen nur wenig Untersuchungsmaterial zur Verfügung steht und sich die funktionellen Versuche schwierig gestalten, da Langerhans-Zellen und IDEC genau voneinander abgegrenzt werden müssen, um den Mannoserezeptor auf nur einer der beiden Zellarten zu untersuchen. Des Weiteren muß die Pinozytose-Aktivität von der Rezeptor-vermittelten Endozytose abgegrenzt werden. Diese Schwierigkeiten konnten überwunden werden, indem die beiden CD1a-positiven Zell-Populationen am Durchflußzytometer getrennt ausgewertet wurden und die Rezeptor-vermittelte Endozytose durch Kontrolluntersuchungen mit Blockade des Rezeptors durch Mannan isoliert betrachtet werden konnte.

4.2 Monozyten exprimieren den Mannoserezeptor nicht

Bei der durchflußzytometrischen Färbung der Monozyten, der Immunphänotypisierung mit dem spezifischen Antikörper D547 des Mannoserezeptors, konnte dieser Rezeptor nicht auf den Monozyten nachgewiesen werden. Bei den funktionellen Untersuchungen der Monozyten am Durchflußzytometer konnte die bei allen Zellen stets stattfindende Pinozytose mit dem rezeptorunabhängigen und deshalb nur über Pinozytose aufnehmbaren Farbstoff Lucifer Yellow eindeutig dargestellt werden. Dies diente nicht nur dem Nachweis der Pinozytose selbst sondern auch der Abgrenzung der Pinozytose gegenüber der Rezeptor-vermittelten Endozytose. Die Aufnahme des Farbstoffes in die Monozyten während dieser Versuche war nicht sehr stark ausgeprägt. Die Fähigkeit der Monozyten zur Rezeptor-vermittelten Endozytose wurde durch Inkubation der Zellen mit Dextran-FITC, welches an den Mannoserezeptor bindet, aber ebenfalls durch Pinozytose in die Zellen aufgenommen wird, untersucht. Die Zellen zeigten eine mäßige Aufnahme dieses Farbstoffes. Um zu klären, welcher Anteil des Farbstoffes über Pinozytose aufgenommen wurde, wurden die Monozyten mit Mannan, welches an den Mannoserezeptor bindet und ihn blockiert, inkubiert. Es zeigte sich keine

Veränderung der Dextran-FITC-Aufnahme in die Zellen. Das negative Ergebnis der Immunphänotypisierung und die insgesamt mäßige, nicht hemmbare Endozytose sind gut miteinander zu vereinbaren. Somit konnte gezeigt werden, daß der Mannoserezeptor auf den Monozyten nicht exprimiert wird. Dieses Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen der Arbeit von Noorman überein, in welcher der Mannoserezeptor mit dem Antikörper 15-2 auf Monozyten nicht nachgewiesen werden konnte (Noorman et al., 1997). Wurden die Monozyten von dieser Arbeitsgruppe in Kultur genommen, so reiften sie zu Makrophagen heran und exprimierten den Mannoserezeptor ab dem dritten bis vierten Tag der Kultur. Auf den noch undifferenzierten Monozyten konnte er auch von der Arbeitsgruppe um Pontow nicht dargestellt werden (Pontow et al., 1992). In der Literatur wird der Mannoserezeptor als Merkmal reifer Makrophagen beschrieben (Stahl et al., 1978). Zusammengenommen deuten das Ergebnis der vorliegenden Arbeit sowie die Erkenntnisse anderer Arbeitsgruppen darauf hin, daß die Monozyten erst mit ihrer Ausreifung zu Makrophagen den makrophagentypischen Mannoserezeptor auf ihrer Zelloberfläche tragen. Als Monozyten benutzen diese Zellen offenkundig andere Rezeptoren für ihre Aufgaben.

4.3 Der Mannoserezeptor fungiert als Erkennungsmerkmal der MoDC's und Mediator einer effizienten Endozytose

Die Immunphänotypisierung der MoDC's mit dem spezifischen Antikörper D547 des Mannoserezeptors erbrachte ein positives Ergebnis. Der rezeptorunabhängige Farbstoff Lucifer Yellow wurde mit ansteigender Färbezeit in die Zellen inkorporiert, die Pinozytose-Aktivität ließ sich somit eindeutig nachweisen. Bei der Inkubation mit Dextran-FITC nahmen die MoDC's große Mengen dieses an den Mannoserezeptor bindenden Farbstoffes in sich auf. Der Anteil der immerwährenden Pinozytose wurde von der Rezeptor-vermittelten Endozytose durch Blockade des Mannoserezeptors mittels Mannan abgegrenzt. Nach dieser Hemmung ließ sich eine deutliche Verringerung der Endozytose feststellen. Zusammengenommen zeigen das positive Ergebnis der Immunphänotypisierung und die Resultate der funktionellen Versuche, daß die MoDC's den Mannoserezeptor auf ihrer Zelloberfläche tragen und ihn zur Endozytose benutzen. Die Expression des Mannoserezeptors auf den MoDC's war bereits mehrfach beschrieben worden. So konnte die Rezeptor-vermittelte Endozytose und deren Hemmbarkeit bei den MoDC's in durchflußzytometrischen

Untersuchungen mittels von Dextran-FITC und Mannan bereits nachgewiesen werden (Sallusto et al., 1995). Tan konnte den Mannoserezeptor auf den MoDC's unter Verwendung von mannosyliertem bovinem Serumalbumin (BSA) und anderen Liganden nachweisen (Tan et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression des Mannoserezeptors sowohl phänotypisch, als auch funktionell gezeigt werden. Die bereits vorhandenen Resultate konnten somit bestätigt werden. Der Mannoserezeptor wird als Merkmal unreifer dendritischer Zellen gesehen (Sallusto et al., 1995, Tan et al., 1997, Engering et al., 1997, Mommaas et al., 1999). Werden MoDC's in Kultur genommen, so reifen sie aus, der Mannoserezeptor wird vermindert exprimiert (Dong et al., 1999).

Der Mannoserezeptor erleichtert die Antigen-Präsentation, mannosylierte Proteine werden in 200-1000-fach geringerer Konzentration den T-Zellen präsentiert (Tan et al., 1997, Engering et al., 1997). Der Effekt der Mannosylierung konnte auch an sogenannten Altered peptide ligands gezeigt werden (APL), welche von den antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen werden und die Reaktion der T-Lymphozyten blockieren (Tan et al., 1998). Sind die APL mannosyliert, so können sie bereits in 100- bis 1000-fach geringerer Konzentration aufgenommen werden als ohne Mannosylierung und eine Immunantwort der T-Lymphozyten blockieren. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Expression und Funktion des Mannoserezeptors zusammengenommen mit den Erkenntnissen der anderen Arbeitsgruppen über die durch ihn vermittelte effektive Antigenpräsentation an die T-Zellen und den Verlust während der Reifung in Kultur, legt nahe, daß es sich bei den MoDC's um unreife dendritische Zellen handelt, welche genau wie andere dendritische Zellen auch zu außergewöhnlich effizienter Antigenpräsentation fähig sind. Die Expression des Mannoserezeptors wird auf den MoDC's durch IL-10 (Longoni et al., 1998) und Glucocorticoide (Piemonti et al., 1999) gesteigert, die Endozytose-Leistung der Zellen nimmt zu.

Es konnte bislang nicht nur der Mannoserezeptor auf der Zytoplasmamembran der MoDC's gefunden werden, sondern kürzlich auch bei aus frischen Blutmonozyten generierten MoDC's in Kultur die Produktion einer in das Medium sezernierten Variante des Mannoserezeptors beobachtet werden (Jordens et al., 1999). Diese Variante scheint durch Abspaltung des membranständigen Anteils des Rezeptors zu entstehen und mit der synthetisierten Menge des Mannoserezeptors zu korrelieren. Werden die dendritischen Zellen durch entzündungsmediierende Lipopolysaccharide

(LPS) zur Ausreifung gebracht, so wird der Mannoserezeptor vermindert synthetisiert und auch die Menge des im Medium befindlichen Rezeptors nimmt ab. Es konnte die Bindung von Mannose an diese im Medium gelösten Rezeptoren nachgewiesen werden. Weiterhin wurde von der Arbeitsgruppe um Martínez-Pomares und Gordon die Hypothese aufgestellt, daß der sezernierte Mannose-Rezeptor nach Bindung eines mannosylierten Antigens direkt zu den B-Lymphozyten in den folliculären Regionen der Lymphknoten geleitet wird und auf diesem Wege eine Antigenpräsentation ohne vorangehende Prozessierung und Verknüpfung mit den MHC Klasse II Molekülen stattfindet (Martínez-Pomares und Gordon, 1999).

4.4 Langerhans-Zellen sind dendritische Zellen ohne Mannoserezeptor

Bei den Langerhans-Zellen aus der normalen sowie der entzündlich veränderten Haut wurde die Immunphänotypisierung mit dem spezifischen Antikörper D547 des Mannoserezeptors in der APAAP-Färbung wie auch in der durchflußzytometrischen Untersuchung vorgenommen. In beiden Experimenten ergab sich für die Langerhans-Zellen aus der gesunden und der entzündeten Haut ein negatives Ergebnis. Der Mannoserezeptor konnte somit nicht durch den verwendeten Antikörper D547 dargestellt werden. In den funktionellen Versuchen, ebenfalls mit Langerhans-Zellen der normalen und der entzündeten Haut durchgeführt, konnte die Pinozytose mit dem rezeptorunabhängigen Farbstoff Lucifer Yellow nachgewiesen werden. Die Aufnahme von Dextran-FITC in die Zellen war nicht sehr groß. Um über den Mechanismus der Endozytose, über welchen das Dextran in die Zellen aufgenommen worden war, Kenntnis zu erlangen, wurden in einer weiteren Versuchsreihe die Zellen vor der Dextranzugabe mit Mannan inkubiert, um den Anteil der Pinozytose abgrenzen zu können. Die Endozytose ließ sich durch diese Mannaninkubation vor Versuchsbeginn nicht hemmen. Die Ergebnisse der funktionellen Versuche zur Endozytose zeigen zusammengenommen, daß die Langerhans-Zellen mittels Pinozytose mannosylierte Proteine aus ihrer Umgebung aufnehmen, aber nicht zu Rezeptor-vermittelter Endozytose fähig sind. Diese Resultate stimmen mit denjenigen der Immunphänotypisierung überein. Es konnte an Langerhans-Zellen aus gesunder und entzündeter Haut, sowohl in situ als auch aus dem Zellverband isoliert, gezeigt werden, daß sie den Mannoserezeptor nicht auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Dies bestätigt die Ergebnisse der Immunogold-Färbung an Langerhans-Zellen, bei

welcher der Mannoserezeptor ebenfalls nicht auf den Langerhans-Zellen dargestellt werden konnte (Mommaas et al., 1999). Es wurden hierbei nur Proben der normalen Haut untersucht. Auch auf Langerhans-Zellen bei Mäusen konnte der Mannoserezeptor nicht nachgewiesen werden (Linehan et al., 1999). Andere Arbeitsgruppen konnten eine Bindung von Mannose und Fucose an den Langerhans-Zellen feststellen und postulierten die Expression des Mannoserezeptors auf den Langerhans-Zellen (Condaminet et al., 1998). Die Aufnahme der von Condaminet und seinen Mitarbeitern verwendeten Substanzen, Fucose- und Mannose-BSA, in die Zelle, könnte auch durch die stets stattfindende Pinozytose bedingt gewesen sein, welche in den funktionellen Versuchen von der Rezeptor-vermittelten Endozytose abgegrenzt werden muß. Es gelang dieser Arbeitsgruppe, humane Langerhans-Zellen mit verschiedenen für den Mannoserezeptor spezifischen Antikörpern anzufärben. Andere CD1a negative Zellen der Haut konnten mit diesen Antikörpern nicht angefärbt werden, die Bindung eines für den Mannoserezeptor unspezifischen Antikörpers an die Langerhans-Zellen wurde von Condaminet nicht untersucht.

4.5 Funktion der Langerhans-Zellen

Die Funktion der Langerhans-Zellen liegt in der Antigenaufnahme und Präsentation löslicher Proteinantigene. Daher und auch wegen ihrer geringen Kapazität bei der Endozytose erscheint es verwunderlich, daß sie den Mannoserezeptor und mit ihm die Fähigkeit zur raschen und effizienten Antigenaufnahme mannosylierter Proteine und Antigene nicht besitzen. Die nachgewiesene relativ geringe Aktivität in der Aufnahme von Substraten bei den Langerhans-Zellen bestätigt die bereits gewonnenen Erkenntnisse über die schwach ausgeprägte Endozytose-Leistung der Langerhans-Zellen (Steinman et al., 1998). Auch in ihrer Ultrastruktur sind Langerhanszellen nicht auf große Endozytosefähigkeit ausgelegt, sie besitzen nur wenige Endosomen und Lysosomen mit entsprechenden lysosomalen Enzymen wie β -Hexosaminidase (Mommaas et al., 1999). Da der Mannoserezeptor zur Bindung mannosylierter Antigene dient und sich diese vor allem auf pathogenen Bakterien (Koning, 1997, Ezekowitz et al., 1991, Stahl und Ezekowitz, 1998) und Pilzen (Buentke et al., 2000) finden, ist er möglicherweise nicht auf den Langerhans-Zellen notwendig.

4.6 Langerhans-Zellen zeigen deutliche Unterschiede zu den übrigen antigenpräsentierenden Zellen

Im Unterschied zu den beiden übrigen untersuchten Arten dendritischer Zellen, MoDC's und IDEC, der Mannoserezeptor auf den Langerhans-Zellen nicht gefunden werden. Da Langerhans-Zellen als unreife dendritische Zellen der Haut gelten, wäre die Expression des Mannoserezeptors auf ihrer Zelloberfläche zu erwarten. Da dies nicht der Fall ist, kann er somit nur für MoDC's und andere unreife myeloide dendritische Zellen des interstitiellen Typs als Merkmal angesehen werden, nicht für Langerhans-Zellen (Banchereau und Steinman, 1998). Auch in der Endozytose unterschieden sich die Langerhans-Zellen, bedingt durch das Fehlen des Mannoserezeptors auf ihrer Zelloberfläche, stark von den MoDC's. Ihre Aktivität in der Aufnahme des Dextrans war wesentlich geringer. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Mommaas et al. überein, hier wurde bei Endozytoseversuchen eine 20-fach geringere Aufnahme von bovinem Serumalbumin (BSA) durch die Langerhans-Zellen im Vergleich zu den MoDC's festgestellt (Mommaas et al., 1999). Unterschiede können auch in der Ultrastruktur nachvollzogen werden. Langerhans-Zellen weisen nach Pinozytoseversuchen nur wenige Endosomen auf, bei MoDC's konnten dagegen im Anschluß an Makropinozytose-Experimente viele Makropinosomen im Zellinneren gefunden werden (Sallusto et al., 1995). In der gemischten Leukozyten-Reaktion (MLR) benötigten die Langerhans-Zellen deutlich höhere Konzentrationen eines Antigens, als die MoDC's, um es den T-Zellen zu präsentieren (Mommaas et al., 1999). Für ihre wirksame Antigenpräsentation besitzen unreife dendritische Zellen in ihrem Zytoplasma zahlreiche MHC Klasse II-positive Endosomen und Lysosomen (Mellman et al., 1998). In ihrem MHC Klasse II Kompartiment unterscheiden sich die Langerhans-Zellen von den übrigen antigenpräsentierenden Zellen durch nur in geringen Mengen vorhandenen lysosomalen Enzymen (Mommaas et al., 1999). Zusammengenommen lassen diese Ergebnisse vermuten, daß Langerhans-Zellen nicht sehr eng mit MoDC's verwandt sind (Caux et al., 1996, Strunk et al., 1997), sondern sich als eigenständige antigenpräsentierende Zellen darstellen, die sich von den übrigen unreifen dendritischen Zellen unterscheiden.

4.7 IDEC tragen als dendritische Zellen der Haut den Mannose-rezeptor

In der APAAP-Färbung an Schnitten aus der entzündlichen Haut konnten in den suprabasalen und in den basalen Schichten der Epidermis sowie in der Dermis Zellen mit dendritischer Form, welche den Mannoserezeptor exprimierten, nachgewiesen werden. Dabei waren in der Dermis deutlich mehr Zellen als in der Epidermis zu finden. Bei der Immunphänotypisierung von Zellproben aus entzündlicher Haut konnten die IDEC eindeutig von den Langerhans-Zellen abgegrenzt werden, und es konnte mit dem Antikörper D547 der Mannoserezeptor auf den IDEC nachgewiesen werden. Bei den durchflußzytometrischen Untersuchungen der Pinozytose und der Rezeptor-vermittelten Endozytose konnte die pinozytotische Aktivität der IDEC unter Verwendung von Lucifer Yellow nachgewiesen werden. Bei der Inkubation der Zellen mit Dextran-FITC ergab sich eine mäßige Absorption dieses rezeptorabhängigen Farbstoffes in die Zellen. Um herauszufinden, welcher Anteil des Dextrans durch Pinozytose und welcher über Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zellen aufgenommen worden war, wurden die IDEC in einem weiteren Versuchsansatz mit Mannan inkubiert, bevor die Dextranzugabe erfolgte. Es zeigte sich hierbei eine deutliche Hemmbarkeit der Dextranaufnahme in die IDEC. Der gehemmte Anteil der Endozytose entsprach der Rezeptor-vermittelten Endozytose. Das nach Mannanzugabe in den Zellen befindliche Dextran-FITC war rezeptorunabhängig durch Pinozytose aufgenommen worden. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der Immunphänotypisierung und der funktionellen Versuche, daß die IDEC den Mannoserezeptor auf ihrer Zelloberfläche exprimieren und ihn zur Endozytose der an ihn gebundenen Moleküle benutzen. Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Langerhans-Zellen und IDEC nach Immunogoldfärbung konnten im Zellinneren der IDEC, von den Langerhans-Zellen durch das Fehlen der Birbeck-Granula abgegrenzt, zahlreiche Clathrin-umhüllte Vesikel gezeigt werden, welche mit größeren endosomartigen Strukturen in Kontakt traten. In der Immunogoldfärbung der IDEC mit dem Antikörper D547 konnten die Goldpartikel auf der Zelloberfläche und im Inneren gesehen werden. Mit diesen Beobachtungen in der Immunogoldfärbung, welche durch die Bindung des Antikörpers D547 und die in den Zellen auftretenden Vesikel die Expression und die Funktion des Mannoserezeptors bei den IDEC anzeigen, ergänzen sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu einem schlüssigen Gesamtbild.

4.8 Der Mannoserezeptor im Zusammenhang mit der Funktion der IDEC

Es konnte für Langerhans-Zellen gezeigt werden, daß sie in der gesunden Haut als ein Netzwerk in der Epidermis liegen und bei Auftreten einer Hauterkrankung als aktivierte Zellen in die Dermis wandern, wo sie auch in Lymphspalten zu finden sind (Katou et al., 2000). Wie Langerhans-Zellen könnten die IDEC in der Epidermis die Antigene aufnehmen um anschließend in die Dermis und weiter zu den T-Zellen, welchen sie die aufgenommenen Antigene präsentieren könnten, zu gelangen. Die Expression des Mannoserezeptors, Merkmal und wichtiges funktionelles Molekül der unreifen dendritischen Zellen, auf ihrer Zelloberfläche unterstreicht die Vermutung, daß die IDEC den in der Antigen-Aufnahme sehr effizienten unreifen dendritischen Zellen zuzordnen sind (Banchereau und Steinman, 1998, Bell et al., 1999). Der Mannoserezeptor ermöglicht den IDEC die Rezeptor-vermittelte Endozytose mannosylierter Antigene. Diese könnte beim atopischen Ekzem zur erleichterten Antigenpräsentation des Glycoproteinallergens beitragen (Bieber, 1997), analog der durch den Mannoserezeptor erleichterten Antigenpräsentation anderer dendritischer Zellen (Tan et al., 1997). Es konnte auch gezeigt werden, daß beim atopischen Ekzem nicht die Langerhans-Zellen sondern die IDEC für die Bindung des IgE und die Expression des FcεRI relevant sind (Wollenberg et al., 1996, 1999). Zudem wurde angenommen, daß die IDEC bei Psoriasis vulgaris und atopischem Ekzem eine Rolle in der Abwehr mannosylierter pathogener Bakterien oder Pilze, welche die Läsionen besiedeln könnten, spielen. Die Abwehr pathogener Mikroorganismen durch Mannoserezeptor-tragende Zellen ist bereits häufig beschrieben worden (Schlesinger, 1993, Ezekowitz et al., 1991, Marodi et al., 1993, Blackwell et al., 1985, Kahn et al., 1995). Dabei bindet der Mannoserezeptor die Saccharide in der Zellwand der Mikroorganismen. Da sich diese Saccharide nur auf den pathogenen Keimen und nicht auf den Zellen des Organismus selbst finden, dient der Mannoserezeptor hierbei auch der Unterscheidung zwischen körpereigenen- und körperfremden Antigenen (Koning, 1997). Es ist möglich, daß die IDEC mit Hilfe des auf der Zelloberfläche exprimierten Mannoserezeptors eine derartige immunologische Funktion ausüben. Es konnte auch nachgewiesen werden, daß unreife dendritische Zellen eine Rolle bei der Abwehr von eingehüllten Viren spielen (Milone und Fitzgerald-Bocarsly, 1998). Dabei vermittelt der Mannoserezeptor die Produktion von IFN- α , welches für die

Abwehr von Viren wichtig ist. IFN- α - Produktion durch dendritische Zellen wurde bereits beschrieben (Svensson et al., 1996).

In Versuchen mit dendritischen Zellen, welche aus der Lymphe von immunisierten Mäusen isoliert wurden, konnte gezeigt werden, daß neben der Aktivierung der T-Zellen die Produktion spezifischer Antikörper der Klassen IgM und IgG angeregt werden konnte (Berney et al., 1999). Die Regulation des Mannoserezeptors durch IL-10 und Glucocorticoide wurde auf den IDEC nicht untersucht, doch die Aufregulation der Rezeptorexpression und die Steigerung der Rezeptor-vermittelten Endozytose durch IL-10 sowie durch Glucocorticoide bei den MoDC's sind bereits bekannt (Longoni et al., 1998, Piemonti et al., 1999), wie auch die Herunterregulation des Mannoserezeptors auf den MoDC's im Rahmen der Ausreifung durch LPS (Lipopolysaccharid) TNF- α , und IL-1 (Sallusto et al., 1995).

4.9 Unterschiede in der Expression des Mannoserezeptors auf den IDEC bei verschiedenen Hauterkrankungen

Proben, welche aus verschiedenen Hauterkrankungen isoliert worden waren, wurden untersucht. Dabei zeigte sich ein Unterschied in der Stärke der Expression des Mannoserezeptors auf den IDEC zwischen denjenigen Zellen, welche aus Läsionen bei allergischem Ekzem isoliert worden waren und denjenigen aus Läsionen bei Psoriasis vulgaris. Es konnte eine etwas stärkere Expression des Rezeptors auf den IDEC aus entzündlich veränderten Hautarealen bei allergischem Ekzem im Vergleich zu IDEC aus Entzündungsherden bei Psoriasis vulgaris beobachtet werden. Diese erwies sich jedoch als nicht signifikant. Für alle übrigen Hauterkrankungen waren die Anzahlen der Proben zu gering, um über die Expressionsstärke des Mannoserezeptors auf den IDEC eine Aussage treffen zu können. Die IDEC zeigten jedoch bei allen Proben aus entzündlich veränderter Haut eine deutliche Rezeptorexpression und unterschieden sich damit signifikant von den Langerhans-Zellen, welche den Mannoserezeptor nicht auf ihrer Zelloberfläche exprimierten.

4.10 Ursprung und Verwandtschaft der IDEC

Der Ursprung der IDEC ist noch unklar. Die Expression des Mannoserezeptors auf der Zelloberfläche sowie die verminderte Expression des Rezeptors nach kurzer Zeit der Zellen in Kultur zeigen Ähnlichkeit mit der Expression des Rezeptors auf den

MoDC's. Bei beiden Zellarten wurde während der Kultur der Versuch unternommen, die einzelnen Mannoserezeptoren durch verschiedene Reagentien zu vernetzen. Weder bei den IDEC noch bei den MoDC's ließ sich dadurch die Ausreifung der Zellen beeinflussen. Die Ähnlichkeit zwischen IDEC und MoDC's zeigte sich auch bei der Immunphänotypisierung. Dabei konnte gezeigt werden, daß beide Zelltypen den Mannoserezeptor exprimieren, die IDEC in geringerem Maße, als die MoDC's. Dieses Resultat läßt sich gut mit den Ergebnissen aus vorangegangenen Immuno-Gold-Färbungen der MoDC's (Tan et al., 1997) und der IDEC mit dem für den Mannoserezeptor spezifischen Antikörper D547 vereinbaren. Bei diesen Untersuchungen zeigten die IDEC eine ähnliche Verteilung der Goldpartikel wie MoDC's, wobei hier die im Vergleich zu den MoDC's geringere Intensität der Goldfärbung auf den IDEC die geringere Expression des Mannoserezeptors auf den IDEC anzeigte. In der Rezeptor-vermittelten Endozytose zeigten sich die IDEC deutlich schwächer, als die MoDC's.

Unterschiede zwischen den Langerhans-Zellen und den IDEC sind bekannt. So unterscheiden sich diese beiden dendritischen Zellarten der Haut durch ihre unterschiedlichen Oberflächenrezeptoren, durch welche sie auch ursprünglich am Durchflußzytometer voneinander abgegrenzt wurden (Wollenberg et al., 1996). Auch treten die IDEC nur in entzündlichen Hautläsionen auf. Durch die Expression des Mannoserezeptors auf den IDEC und nicht auf den Langerhans-Zellen und die sich dadurch ergebenden verschiedenen Endozytose-Fähigkeiten, konnten die beiden Zellpopulationen weiter differenziert werden. Die bei den Untersuchungen zur Ultrastruktur gewonnenen Erkenntnisse (Mommaas et al., 1999) verdeutlichen ebenfalls den Unterschied zwischen den beiden Arten dendritischer Zellen in der entzündeten Haut. Zusammengekommen bestärken diese Ergebnisse die Annahme, daß die IDEC eine eigenständige Zellart sind, mit den MoDC's und nicht mit den Langerhans-Zellen verwandt sind, von den Monozyten abstammen und zu den unreifen dendritischen Zellen vom interstitiellen Typ gehören (Banchereau und Steinman, 1998, Bell et al., 1999).

4.11 Monozyten phagozytieren E.coli ohne den Mannoserezeptor zu exprimieren

In Versuchen mit opsonisierten E.coli zeigten sich die Monozyten in der Lage, die Bakterien zu phagozytieren. Diese Phagozytose fand unabhängig vom Mannoserezeptor statt, da dieser auf den Monozyten bei der Immunphänotypisierung nicht nachgewiesen werden konnte. Bei den Versuchen mit löslichen Proteinen ergab sich, daß die Monozyten lediglich zur Pinozytose fähig sind. Eine Aufnahme mannosylierter Antigene mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose ist ihnen nicht möglich. Das Fehlen des Rezeptors auf der Zytoplasmamembran frisch aus dem Blut isolierter Monozyten wurde beschrieben (Ezekowitz et al., 1983, Pontow et al., 1992). Das Ergebnis läßt sich auch damit in Einklang bringen, daß der Mannoserezeptor als Merkmal reifer gewebsständiger Makrophagen in den einzelnen Organen gilt, wohingegen zirkulierende Phagozyten den Rezeptor nicht exprimieren (Ezekowitz und Stahl, 1988). Der Mannoserezeptor wird als phagozytose-vermittelnder Rezeptor auf den mit cDNA des Mannoserezeptors transferierten Cos-I-Zellen beschrieben (Ezekowitz et al., 1990). Zudem kommt ihm möglicherweise eine Bedeutung bei der Induktion der TNF- α -Produktion, Sekretion lysosomaler Enzyme und zytotoxischen Wirkung der Makrophagen zu (Stahl et al., 1978, Pontow et al., 1992). Im Serum zirkuliert ein Mannose-bindendes Protein (MBP), welches von den Hepatozyten synthetisiert und sezerniert wird (Ezekowitz et al., 1990) und nach der Bindung von bestimmten Viren (Ezekowitz et al., 1989) oder mannosereichen Bakterien (Kuhlman et al., 1989) den Phagozyten ohne Mannoserezeptor die Bindung, Aufnahme und Bearbeitung des entsprechenden Pathogens erleichtert (Kuhlman et al., 1989). Wie die Phagozytose der opsonisierten E.coli bei den Experimenten der vorliegenden Arbeit zustande kam, kann nicht schlüssig erklärt werden. Es ist unklar, durch welchen Rezeptor die Inkorporation der Bakterien vermittelt wurde. Möglicherweise handelte es sich dabei um eine dem Mannoserezeptor verwandte Struktur, welche durch den Antikörper D547 und die funktionellen Versuche nicht erfaßt werden konnte. Es gibt mehrere dem Mannoserezeptor verwandte Oberflächenrezeptoren. So existiert beispielsweise ein Galactose/N-Acetylgalactosamin-bindender Rezeptor auf humanen Makrophagen (Suzuki et al., 1996). Weiterhin ist auf Zellen von Mäusen ein dem Mannoserezeptor in Bindungsspezifität und Bau analoger Rezeptor, DEC 205 bekannt (Swiggard et al., 1995).

4.12 MoDC's zeigen keine Phagozytose trotz der Expression des Mannoserezeptors auf der Zelloberfläche

Die unreifen dendritischen Zellen, die aus den Monozyten gewonnen wurden, zeigten keine phagozytotische Aktivität bei der Inkubation mit opsonisierten E.coli. Da sie den Ergebnissen der Immunphänotypisierung und der funktionellen Untersuchungen zufolge den Mannoserezeptor auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, könnte bei diesen Zellen die Fähigkeit zur Phagozytose vermutet werden. Ezekowitz et al. konnten an Cos-1 Zellen, welche Hefe phagozytierten, zeigen, daß zur Aufnahme der Partikel in die Zelle das zytoplasmatische Ende des Mannoserezeptors eine entscheidende Rolle spielt (Ezekowitz et al., 1990). Ist es in seiner Sequenz verändert, so kann durch den Mannoserezeptor keine Phagozytose vermittelt werden. Möglicherweise besitzen die dendritischen Zellen einen Mannoserezeptor ohne oder mit verändertem zytoplasmatischem Ende und können deshalb nicht phagozytieren.

4.13 Langerhans-Zellen sind ausschließlich zur Pinozytose fähig

In den Versuchen zur Phagozytose konnte bei den Langerhans-Zellen aus der normalen und der entzündlichen Haut keine Aufnahme der E.coli in die Zellen beobachtet werden. Der Mannoserezeptor konnte auf ihnen nicht nachgewiesen werden. Die Langerhans-Zellen können demnach lösliche mannosylierte Proteinantigene nur über Pinozytose in sich aufnehmen. Reis e Sousa et al. konnten bei Langerhans-Zellen die Phagozytose von Zymosan, einem Bestandteil der Hefezellwand sowie von mehreren Bakterien, wie Corynebacterium parvum und Staphylococcus aureus und von Latexpartikeln nachweisen (Reis e Sousa et al., 1993). Die abweichenden Beobachtungen könnten sich dadurch ergeben, daß die Versuche an Langerhans-Zellen von Mäusen durchgeführt wurden, oder auch dadurch, daß die Aufnahme vor allem des Zymosans in die Zellen über Glycanrezeptoren stattfand, die möglicherweise mit dem Makrophagen-Mannoserezeptor verwandt sind.

4.14 IDEC phagozytieren keine E.coli, obwohl sie den Mannoserezeptor tragen

Auf den IDEC konnte der Mannoserezeptor durch den spezifischen Antikörper D547 nachgewiesen werden. Zudem konnte in den Versuchen gezeigt werden, daß die IDEC durch den Mannoserezeptor zur Dextranaufnahme befähigt sind. In den

Versuchen mit opsonisierten E.coli konnte gezeigt werden, daß die IDEC trotz ihrer Rezeptorexpression nicht zur Phagozytose von Bakterien in der Lage sind. Das Vorkommen des Mannoserezeptors ist somit auch bei den IDEC nicht automatisch mit der Fähigkeit zur Phagozytose verbunden. Die Unfähigkeit der Zellen zur Phagozytose trotz des Mannoserezeptors entspricht den an den MoDC's gemachten Beobachtungen. Sie bestärken die Vermutung, daß die IDEC von Blutmonozyten abstammen und mit den MoDC's verwandt sind.

4.15 Ausblick

Die Langerhans-Zellen unterscheiden sich in einigen Merkmalen von den übrigen dendritischen Zellen. Ein wesentlicher Unterschied ist die fehlende Expression des Mannoserezeptors auf ihrer Zelloberfläche. Ohne ihn besitzen sie nur die Fähigkeit zur Pinozytose, wodurch ihre Endozytosekapazität insgesamt gering ist. Dies spiegelt sich auch in ihrer Ultrastruktur wider. So weisen die Langerhans-Zellen nur wenige Pinosomen (Sallusto et al., 1995) und ein gegenüber den MoDC's verschiedenes MHC Klasse II Kompartiment (Mommaas et al., 1999) auf. Um T-Lymphozyten zu stimulieren, benötigen Langerhans-Zellen deutlich höhere Konzentrationen eines mannosylierten Proteinantigens als die MoDC's (Mommaas et al., 1999). Welche Gründe diese Unterschiede haben, und welche Rolle die Langerhans-Zellen in der normalen Haut, und die beiden verschiedenen Arten von dendritischen epidermalen Zellen gemeinsam in der entzündeten Haut folglich spielen, bleibt zu untersuchen. Möglicherweise sind die Langerhans-Zellen nicht die relevanten antigenpräsentierenden Zellen in der entzündeten Haut.

Ähnlichkeiten zwischen den IDEC und den MoDC's konnten bereits herausgefunden werden. So konnte die gleichartige Herunterregulation des Mannoserezeptors der Zellen in Kultur gezeigt werden, ebenso konnte bei beiden Zellarten die Ausreifung in Kultur nicht durch Kreuzvernetzung der einzelnen Rezeptormoleküle auf der Zelloberfläche beeinflußt werden. Ein weiteres gemeinsames Merkmal ist die Expression des Mannoserezeptors auf den MoDC's und den IDEC. Die Steigerung der Expression des Mannoserezeptors auf den MoDC's unter dem Einfluß von IL-10 (Longoni et al., 1998) und Glucocorticoide (Piemonti et al., 1999) ist bereits bekannt. Die Regulation des Mannoserezeptors auf den IDEC bleibt zu untersuchen.

Bei in Kultur genommenen MoDC's konnte die Produktion eines nicht membranständigen Mannoserezeptors beobachtet werden (Martínez-Pomares et al., 1999). Die Funktion dieses Rezeptors wurde in der von Prozessierung und Präsentation auf den MHC Klasse II Molekülen unabhängigen Antigenpräsentation gesehen. Ob IDEC ebenfalls solche nicht membranständigen Mannoserezeptoren sezernieren, ist nicht bekannt.

Dendritische Zellen waren bereits in der Durchflußzytometrie als übereinstimmend mit IFN- α -produzierenden Zellen beschrieben worden (Svensson et al., 1996). Bei den MoDC's konnte die Produktion von IFN- α als Antwort auf eine Infektion hülltragender Viren, wie HSV und HIV, nachgewiesen werden (Milone und Fitzgerald-Bocarsly, 1998). Die Produktion des IFN- α wurde durch glycosylierte Proteine der Virushülle induziert und konnte durch Monosaccharide wie Fucose, durch Mannan und Antiserum gegen den Mannoserezeptor gehemmt werden. Es wurde daher angenommen, daß der Mannoserezeptor auf den dendritischen Zellen eine Rolle bei dieser IFN- α -Produktion und damit bei der Abwehr von hülletragenden Viren spielt. IDEC wurden noch nicht auf die Produktion von IFN- α untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Monozyten, welche den Mannoserezeptor nicht exprimieren, zur Internalisierung von Bakterien fähig sind, dendritische Zellen, MoDC's und IDEC, die den Mannoserezeptor auf ihrer Zelloberfläche tragen, keine Bakterien in sich aufnehmen. Langerhans-Zellen besitzen weder den Mannoserezeptor, noch können sie Bakterien phagozytieren.

5 Zusammenfassung

Vor einigen Jahren wurde in der entzündlichen Haut neben den Langerhans-Zellen die Existenz einer weiteren Art dendritischer Zellen, der sogenannten Inflammatorischen Dendritischen Epidermalen Zellen (IDEC) herausgearbeitet. Über Herkunft, Verwandtschaft zu anderen Zellarten und Funktion der IDEC ist bislang wenig bekannt.

Um die Abstammung der IDEC zu erforschen und ihre Rolle in der entzündlichen Haut neben jener der Langerhans-Zellen besser zu verstehen, sollte der Mannoserezeptor auf diesen beiden dendritischen Zellen in der Haut gesucht und die ihnen zur Verfügung stehenden Endozytose-Mechanismen ermittelt werden. In gesonderten Experimenten sollte die Phagozytosefähigkeit der Langerhans-Zellen und der IDEC geprüft werden. Als Kontrollzellen dienten Monozyten und MoDC's, von welchen bereits Daten bekannt sind.

Es wurden APAAP-Färbungen an histologischen Schnitten gesunder und entzündlicher Haut unter Verwendung des spezifischen Antikörpers D547 zur Identifizierung des Mannoserezeptors auf den Langerhans-Zellen und den IDEC vorgenommen. In der durchflußzytometrischen Immunphänotypisierung wurden die jeweiligen Zellen mit dem rezeptorspezifischen Antikörper D547 gefärbt. In durchflußzytometrischen Versuchen wurde die Pinozytose mittels Lucifer Yellow nachgewiesen. Zur Untersuchung der Rezeptor-vermittelten Endozytose wurden die Zellen mit Dextran-FITC inkubiert. Durch Hemmung der Rezeptor-vermittelten Endozytose mittels Mannan wurde die Rezeptor-vermittelte Endozytose von der Pinozytose abgegrenzt. Die Phagozytose der Zellen wurde unter Verwendung von opsonierten E.coli untersucht.

Durch die immunhistologische Färbung und die Phänotypisierung jeweils mit dem Antikörper D547 konnte gezeigt werden, daß sich der Mannoserezeptor nicht auf den Langerhans-Zellen der normalen und der entzündlichen Haut befindet und nur auf den IDEC nachgewiesen werden kann. Er war in der Phänotypisierung der Monozyten nicht, auf den MoDC's dagegen deutlich zur Darstellung zu bringen.

Die Pinozytose konnte bei allen Zelltypen dargestellt werden. Weiterhin konnte unter Verwendung von Dextran-FITC und Hemmung des Mannoserezeptors durch Mannan gezeigt werden, daß Monozyten keine, MoDC's dagegen eine deutliche Rezeptor-vermittelte Endozytose aufweisen. Langerhans-Zellen besitzen die Fähigkeit zur

Rezeptor-vermittelten Endozytose nicht, MoDC's hingegen nehmen mannosylierte Antigene rezeptorgebunden in sich auf. Die Ergebnisse ergeben mit denjenigen der Phänotypisierung ein Konzept, welches sagt, daß Langerhans-Zellen keinen Mannoserezeptor tragen, IDEC jedoch ebenso wie die MoDC's den Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche exprimieren und ihn zur Endozytose benutzen.

Ferner konnte gezeigt werden, daß Blutmonozyten opsonisierte E.coli phagozytieren. MoDC's nahmen keine E.coli in sich auf. Ebenso konnte gezeigt werden, daß Langerhans-Zellen aus normaler und entzündlicher Haut keine Phagozytose-Aktivität entfalten. Auch IDEC phagozytierten E.coli nicht.

Langerhans-Zellen und IDEC konnten weiter voneinander abgegrenzt werden. Die Expression des Mannoserezeptors auf den IDEC und ihre Präsenz ausschließlich in entzündlichen Hautläsionen läßt vermuten, daß sie den in der Antigenpräsentation äußerst effizienten unreifen dendritischen Zellen zuzuordnen sind und ihnen eine Rolle in der Genese des atopischen Ekzems und in der Abwehr pathogener Organismen von entzündeter Haut zukommt. Die Ähnlichkeit der IDEC mit den MoDC's nicht nur in der Rezeptor-vermittelten Endozytose legt die Abstammung dieser Zellen von Blutmonozyten und die Verwandtschaft mit MoDC's und nicht mit den Langerhans-Zellen nahe. Die Expression des Mannoserezeptors und die Phagozytose-Fähigkeit der Zellen erwiesen sich als voneinander unabhängig. Dies erscheint wesentlich, da eine Funktion des Mannoserezeptors bei der Phagozytose bekannt ist.

6 Literaturverzeichnis

1. Ancian P, Lambeau G, Mattéi M-G, Lazdunski M (1995) The human 180 kDa receptor for secretory phospholipases A₂. Molecular cloning, identification of a secreted soluble form, expression and chromosomal localization. *J Biol Chem* 270: 8963-8970
2. Avraméas A, McIlroy D, Hosmalin A, Autran B, Debré P, Monsigny M, Roche A, Midoux P (1996) Expression of a mannose/fucose membrane lectin on human dendritic cells. *Eur J Immunol* 26: 394-400
3. Banchereau J, Steinman R (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252
4. Bartosik J (1998) Cytomembrane-derived Birbeck granules transport horseradish peroxidase to the endosomal compartment in the human Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 99: 53-58
5. Bell D, Young JW, Banchereau J (1999) Dendritic cells. *Adv Immunol* 1999, 72: 255-324
6. Berman B, Chen VL, France DS, Dotz WI, Petroni G (1983) Anatomical mapping of epidermal Langerhans cell densities in adults. *Br J Dermatol* 109: 553-558
7. Berney C, Herren S, Power CA, Gordon S, Martínez-Pomares L, Kosco-Vilbois MH (1999) A member of the dendritic cell family that enters B cell follicles and stimulates primary antibody responses identified by a mannose receptor fusion protein. *J Exp Med* 190: 851-860
8. Bieber T, Rieger A, Neuchrist C, Prinz JC, Rieber EP, Boltz-Nitulescu G, Schreiner O, Kraft D, Ring J, Stingl G (1989) Induction of FcεRII/CD23 on human epidermal langerhans cells by human recombinant interleukin-4 and gamma interferon. *J Exp Med* 170: 309-314
9. Bieber T, Braun-Falco O (1989) Distribution of CD1a-positive cells in psoriatic skin during the evolution of the lesions. *Acta Dermato Venereol (Stockh)* 69: 175-178
10. Bieber T, de la Salle H, Wollenberg A, Hakimi J, Chizzonite R, Ring J, Hanau D, de Salle C (1992) Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (FcεRI). *J Exp Med* 175: 1285-1290

11. Bieber T, Ring J (1992) In vivo modulation of the high-affinity receptor for IgE (FcεRI) on human epidermal Langerhans cells. *Int Arch Allergy Immunol* 99: 204-207
12. Bieber T (1992) IgE-Rezeptoren auf Langerhans-Zellen. *Hautarzt* 43: 753-762
13. Bieber T (1997) FcεRI-expressing antigen-presenting cells: new players in the atopic game. *Immunol Today* 1997, 18: 311-313
14. Bijsterbosch MK, Donker W, Van de Bilt H, Van Weely S, Van Berkel TJ, Aerts JM (1996) Quantitative analysis of the targeting of mannose-terminal glucocerebrosidase. Predominant uptake by liver endothelial cells. *Eur J Biochem* 237: 344-349
15. Birbeck MS, Breathnach AS, Everall JD, (1961) An electron microscope study of basal melanocytes and high-level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo. *J Invest Dermatol* 37: 51-63
16. Blackwell JM, Ezekowitz RAB, Roberts MB, Channon JY, Sim RB, Gordon S (1985) Macrophage complement and lectin-like receptors binds leishmania in the absence of serum. *J Exp Med* 162: 324-331
17. Bos JD, Hulsebosch HJ, Krieg SR, Bakker PM, Cormane RH (1983) Immunocompetent cells in psoriasis. In situ immunophenotyping by monoclonal antibodies. *Arch Dermatol Res* 275: 181-189
18. Bruynzeel-Koomen C, van Wichen DF, Toonstra J, Berrens L, Bruynzeel PL (1986) The presence of IgE molecules on epidermal Langerhans cells in patients with atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 278: 199-205
19. Buentke E, Zargari A, Heffler LC, Avila-Cariño J, Savolainen J, Scheynius A (2000) Uptake of the yeast *Malassezia furfur* and its allergenic components by human immature CD1a⁺ dendritic cells. *Clinical and Experimental Allergy* 30: 1759-1770
20. Caux C, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, Vanbervliet B, Jacquet C (1995) Human dendritic Langerhans cells generated in vitro from CD34⁺ progenitors can prime naive CD4⁺ T cells and process soluble antigen. *J Immunol* 155: 5427-5435
21. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, de Saint-Vis B, Jacquet C, Yoneda K, Schmitt D, Banchereau J (1996) CD34⁺ Hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic pathways in response to GM-CSF + TNF alpha. *J Exp Med* 184: 695-706

22. Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A (1997) Origin, maturation, and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Op Immunol* 9: 10-16
23. Cerio R, Griffiths CE, Cooper KD, Nickoloff BJ, Headington JT (1989) Characterization of factor XIII positive dermal dendritic cells in normal and inflamed skin. *Br J Dermatol* 121: 421-431
24. Cochand L, Isler P, Songeon F, Nicod LP (1999) Human lung dendritic cells have an immature phenotype with efficient mannose receptors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21: 547-554
25. Condaminet B, Péguet-Navarro J, Stahl P, Dalbiez-Gauthier C, Schmitt D, Berthier-Vergnes O (1998) Human epidermal Langerhans cells express the mannose-fucose binding receptor. *Eur J Immunol* 28: 3541-3551
26. Demidem A, Taylor JR, Grammer SF, Streilein JW (1991) T-lymphocyte-activating properties of epidermal antigen-presenting cells resemble cultured normal Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 97: 454-460
27. Dong X, Storkus W, Salter R (1999) Binding and uptake of agalactosyl by mannose receptor on macrophages and dendritic cells. *J Immunol* 163: 5427-5434
27. Drevets DA, Campbell PA (1991) Roles of complement and complement receptor type 3 in phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by inflammatory mouse peritoneal macrophages. *Infec Immun* 59: 2645-2652
28. Drickamer K (1988) Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J Biol Chem* 263: 9557-9560
29. Engering A, Cella M, Fluitsma D, Brockhaus M, Hoefsmit E, Lanzavecchia A, Pieters J (1997) The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *Eur J Immunol* 27: 2417-2425
30. Engering A, Cella M, Fluitsma D, Hoefsmit E, Lanzavecchia A, Pieters J (1997) Mannose receptor mediated uptake and presentation in human dendritic cells. *Adv Exp Med Biol* 417: 183-187
31. Ezekowitz RAB, Sim RB, Hill M, Gordon S (1984) Local opsonization by secreted macrophage complement components. Role of receptors for complement in uptake of zymosan. *J Exp Med* 159: 244-260
32. Ezekowitz RAB, Stahl PD (1988) The structure and function of vertebrate mannose lectin-like proteins. *J Cell Sci Suppl* 9: 121-133

33. Ezekowitz RAB, Kuhlman M, Groopman J, Byrn RA (1989) A human serum mannose-binding protein inhibits in vitro infection by the human immunodeficiency virus. *J Exp Med* 169: 185-196
34. Ezekowitz RAB, Sastry K, Bailly P, Warner A (1990) Molecular characterisation of the human macrophage mannose receptor: Demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeast in Cos-1 cells. *J Exp Med* 172: 1785-1794
35. Ezekowitz RAB, Williams DJ, Koziel H, Armstrong MYK, Warner A, Richards FF, Rose RM (1991) Uptake of pneumocystis carinii mediated by macrophage mannose receptor. *Nature* 351: 155-158
36. Fithian E, Kung P, Goldstein G, Rubinfeld M, Fenoglio C, Edelson R (1981) Reactivity of Langerhans cells with hybridoma antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:2541-2544
37. Gordon S, Ezekowitz RAB (1981) Macrophage neutral proteinases: nature, regulation, and role in the reticuloendothelial system. Vol. III. Plenum, New York, pp. 95-115
38. Gordon S, Fraser I, Chung LP (1988) Mononuclear phagocytes: tissue distribution and functional heterogeneity. *Curr Opin Immunol* 1: 26-35
39. Gordon S (1998) The role of the macrophage in immune regulation. *Res Immunol* 149: 685-688
40. Grabbe J, Haas N, Hamann K, Kolde G, Hakimi J, Czarnetzki BM (1994) Demonstration of the high-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature* 367: 183-186
41. Hamid Q, Boguniewicz M, Leung DYM (1994) Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. *J Clin Invest* 4: 870-876
42. Harris N, Super M, Rits M, Chang G, Ezekowitz RA (1992) Characterization of the murine macrophage mannose receptor: demonstration of the down regulation of receptor expression mediated by interferon- γ occurs at the level of transcription. *Blood* 80: 2363-2373
43. Herz U, Bunikowski R, Renz H (1998) Role of T cells in atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 115: 179-190
44. Howard CJ, Sopp P, Brownlie J, Kwong LS, Parsons KR, Taylor G (1997) Identification of two distinct populations of dendritic cells in afferent lymph that vary in their ability to stimulate T cells. *J Immunol* 159: 5372-5382

45. Hu-Li J, Shevach EM, Mizuguchi J, Ohara J, Mosman T, Paul WEB (1987) Cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) is a potent costimulant for normal resting T lymphocytes. *J Exp Med* 165: 157-172
46. Inaba K, Swiggard WJ, Inaba M, Meltzer J, Mirza A, Sasagawa T, Nussenzweig MC, Steinman RM (1995) Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145.I. Expression on dendritic cells and other subsets of mouse leucocytes. *Cell Immunol* 163: 148-156
47. Ishizaki J, Hanasaki K, Higashino K-I, Kishimo J, Kikuchi N, Ohara O, Arita H (1994) Molecular cloning of pancreatic group I phosphatase A2 receptor. *J Biol Chem* 269: 5897-5904
48. Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM, Nussenzweig MC (1995) The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375: 151-155
49. Jordens R, Thompson A, Amons R, Koning F (1999) Human dendritic cells shed a functional, soluble form of the mannose receptor. *Int Immunol* 11: 1775-1780
50. Kahn S, Wleklinski M, Aruffo A, Farr A, Coder D, Kahn M (1995) *Trypanosoma cruzi* amastigote adhesion to macrophages is facilitated by the mannose receptor. *J Exp Med* 182: 1243-1258
51. Katou F, Haruo O, Saaristo A, Nagura H, Motegi K (2000) Immunological activation of dermal Langerhans cells in contact with lymphocytes in a model of human inflamed skin. *Am J Pathol* 156: 519-527
52. Kinet J-P (1989) Antibody-cell interactions. *Cell* 57: 351-354
53. Koning F (1997) Enhancement of HLA class II restricted antigen presentation by mannose-receptor-mediated uptake. *Biochem Soc Trans* 25: 664-665
54. Kraal G, van Wilsem P, Breve J (1993) The phenotype of murine Langerhans cells from skin to lymph node. *In Vivo* 7(3): 203-20
55. Kuhlman M, Joiner K, Ezekowitz RAB (1989) The human mannose-binding protein functions as an opsonin. *J Exp Med* 169: 1733-1745
56. Langerhans P (1868) Über die Nerven der menschlichen Haut. *Arch Pathol Anatom* 44: 325-337
57. Lanzavecchia A (1996) Mechanisms of antigen uptake for presentation. *Curr Op Immunol* 8: 348-354

58. Leenen PJM, Campbell PA (1993) Heterogeneity of mononuclear phagocytes. An interpretive review. In *Blood Cell Biochemistry* (M.A Horton, ed.) 5: 29-85. Plenum, New York.
59. Lew DB, Rattazzi MC (1991) Mitogenic affect of lysosomal hydrolases on bovine tracheal myocytes in culture. *J Clin Invest* 88: 1969-1975
60. Lew DB, Songu-Mize E, Pontow SE, Stahl PD, Rattazzi MC (1994) A mannose receptor mediates mannosyl-rich glycoprotein-induced mitogenesis in bovine airway smooth muscle cells. *J Clin Invest* 94: 1855-1863
61. Linehan S, Martínez-Pomares L, Stahl P, Gordon S (1999) Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: in situ expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells. *J Exp Med* 189: 1961-1972
62. Liu ZH, Striker GE, Stetler-Stevenson M, Fukushima P, Patel A, Striker LJ (1996) TNF-alpha and IL-1 alpha induce mannose receptors and apoptosis in glomerular mesangial but not endothelial cells. *Am J Physiol* 270: 1595-1601
63. Longoni D, Piemonti L, Bernasconi S, Mantovani A, Allavena P (1998) Interleukin-10 increases mannose receptor expression and endocytic activity in monocyte-derived dendritic cells. *Int J Clin Lab Res* 28: 162-169
64. Lopez AF, Shannon MF, Chia M-M, Park L, Vadas MA (1992) Regulation of human eosinophil production and function by interleukin-5. *Immunol Ser* 57: 549-571
65. Marodi L, Schreiber S, Anderson DC, MacDermott RP, Korchak HM, Johnston RB (1993) Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferon gamma. Increased phagocytosis, killing, and calcium signal mediated by a decreased number of mannose receptors. *J Clin Invest* 91: 2596-2601
66. Martínez-Pomares L, Kosco-Vilbois M, Darley E, Tree P, Herren S, Bonnefoy JY, Gordon S (1996) Fc chimeric protein containing the cysteine-rich domain of the murine mannose receptor binds to macrophages from splenic marginal zone and lymph node subcapsular sinus and to germinal centers. *J Exp Med* 184: 1927-1937
67. Martínez-Pomares L, Gordon S (1999) Potential role of the mannose receptor in antigen transport. *Immunology Letters* 65: 9-13
68. MacKie RM (1981) Initial event in mycosis fungoides of the skin is viral infection of epidermal Langerhans cells. *Lancet* 2: 283-285

69. McMillan EM, Beeman K, Wasik R, Everett MA (1982) Demonstration of OKT 6-reactive cells in mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol* 6: 880-887
70. Mellman I, Turley SJ, Steinman RM (1998) Antigen processing for amateurs and professionals. *Trends Cell Biol* 8: 231-237
71. Metchnikoff E (1884) Concerning the relationship between phagocytes and anthrax bacilli. *Virchows Arch Abt Pathol Anat* 97: 502-506 (reprinted in translation by Magasanik D and Coons AH *Rev Infect Dis* 1994, 6: 761-770)
72. Mihm MC, Soter NA, Dvorak HF, Austen KJ (1976) The structure of normal skin and the morphology of atopic eczema. *J Invest Dermatol* 67: 305-312
73. Milone M, Fitzgerald-Bocarsly P (1998) The mannose receptor mediates induction of IFN- α in peripheral blood dendritic cells by enveloped RNA and DNA viruses. *J Immunol* 161: 2391-2399
74. Mommaas A, Mulder A, Jordens R, Out C, Tan A, Cresswell P, Kluin P, Koning F (1999) Human epidermal Langerhans cells lack functional mannose receptors and a fully developed endosomal/lysosomal compartment for loading of HLA class II molecules. *Eur J Immunol* 29: 571-580
75. Nathan C (1987) Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 79: 319-326
76. Nestle FO, Zheng XG, Thompson CB, Turka LA, Nickoloff BJ (1993) Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J Immunol* 151: 6535-6545
77. Nestle FO, Filgueira L, Nickoloff BJ, Burg G (1998) Human dermal dendritic cells process and present soluble protein antigens. *J Invest Dermatol* 110: 762-766
78. Nestle FO, Turka LA, Nickoloff BJ (1994) Characterization of dermal dendritic cells in psoriasis: autostimulation of T lymphocytes and induction of Th 1 type cytokines. *J Clin Invest* 94: 202-209
79. Noorman F, Braat E, Barrett-Bergshoeff M, Barbé E, van Leeuwen A, Lindeman J, Dingeman C (1997) Monoclonal antibodies against the human mannose receptor as a specific marker in flow cytometry and immunohistochemistry for macrophages. *J Leukoc Biol* 61: 63-72
80. Pène J, Rousset F, Chrétien I, Bonnefoy J-Y, Spits H, Yokota T, Arai K-I, Banchereau J (1988) IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin-4 and suppressed by interferons and prostaglandin E₂. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 6880-6884

81. Piemonti L, Monti P, Allavena P, Leone BE, Caputo A, Di Carlo V (1999) Glucocorticoids increase the endocytic activity of human dendritic cells. *Int Immunol* 11: 1519-1526
82. Pontow SE, Kery V, Stahl PD (1992) Mannose Receptor. *Int Rev Cytol* 137 B: 221-244
83. Racoosin EL, Swanson JA (1989) Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) stimulates pinocytosis in bone marrow-derived macrophages. *J Exp Med* 170: 1635-1648
84. Racoosin EL, Swanson JA (1992) M-CSF-induced macropinocytosis increases solute endocytosis but not receptor-mediated endocytosis in mouse macrophages. *J Cell Sci* 102: 867-880
85. Reis e Sousa C, Stahl P, Austyn J (1993) Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J Exp Med* 178: 509-519
86. Romani N, Lenz A, Glassel H, Stossel H, Stanzl U, Majdic O, Fritsch P, Schuler G (1989) Cultured human Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotype and function. *J Invest Dermatol* 93: 600-609
87. Sallusto F, Lanzavecchia A (1994) Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J Exp Med* 179: 1109-1118
88. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A (1995) Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182: 389-400
89. Savill J, Dransfield I, Hogg N, Haslett C (1990) Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 343: 170-173
90. Schlesinger LS (1993) Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *Immunology* 150: 2920-2930
91. Schmitt DA, Hanau D, Bieber T, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Fabra M, Pauly G, Cazenave JP (1990) Human epidermal Langerhans cells express only the 40-kilodalton Fc γ receptor (Fc γ RII). *J Immunol* 144: 4284-4290

92. Schuler G, Romani N, Stingl G, Wolff K (1983) Coated Langerhans cell granules in histiocytosis X cells. *Ultrastruct Pathol* 5: 77-82
93. Schuler G, Steinmann RM (1985) Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med* 161: 526-546
94. Shepherd VL, Tarnowski BI, McLaughlin BJ (1991) Isolation and characterization of a mannose receptor from human pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 1779-1784
95. Silberberg I, Baer RL, Rosenthal SA (1989) The role of Langerhans cells in allergic contact hypersensitivity. A review of findings in man and guinea pigs. *J Invest Dermatol* 92: 160S-163S
96. Stahl PD, Rodman JS, Miller MJ, Schlesinger PH (1978) Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates, and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 1399-1403
97. Stahl P (1992) The mannose receptor and other macrophage lectins. *Curr Op Immunol* 4: 49-52
98. Stahl P, Ezekowitz A (1998) The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Op Immunol* 10:50-55
99. Stephenson JD, Shepherd VL (1987) Purification of the human alveolar macrophage mannose receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 148: 883-889
100. Steinman RM, Swanson J (1995) The endocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med* 182: 283-288
101. Steinman RM, Inaba K, Turley S, Pierre P, Mellman I (1999) Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Hum Immunol* 60: 562-567

102. Stingl G, Wolff-Schreiner EC, Pichler WJ, Gschnait F, Knapp W, Wolff K (1977) Epidermal Langerhans cells bear Fc and CD3 receptors. *Nature* 268: 245-246
103. Strunk D, Egger C, Leitner G, Hanau D, Stingl G (1997) A skin homing molecule defines the langerhans cell progenitor in human peripheral blood. *J Exp Med* 185: 1131-1136
104. Suzuki N, Yamamoto K, Toyoshima S, Osawa T, Irimura T (1996) Molecular cloning and expression of cDNA encoding human macrophage C-type lectin: its unique carbohydrate binding specificity for Tn antigen. *J Immunol* 156: 128-135

105. Svensson H, Johannisson A, Nikkila T, Alm GV, Cederblad B (1996) The cell surface phenotype of human natural interferon- α producing cells as determined by flow cytometry. *Scand J Immunol* 44: 164-172
106. Swiggard WJ, Mirza A, Nussenzweig MC, Steinman RM (1995) DEC-205, a 205 kDa protein abundant on mouse dendritic cells and thymic epithelium that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *Cell Immunol* 165: 302-311
107. Takigawa M, Iwatsuki K, Yamada M, Okamoto H, Imamura S (1985) The Langerhans cell granule is an adsorptive endocytic organelle. *J Invest Dermatol* 85: 12-15
108. Tan MCAA, Mommaas M, Drijfhout J, Jordens R, Onderwater J, Verwoerd D, Mulder A, van der Heiden A, Scheidegger D, Oomen L, Ottenhoff T, Tulp A, Neefjes J, Koning F (1997) Mannose receptor-mediated uptake of antigens strongly enhances HLA class II-restricted antigen presentation by cultured dendritic cells. *Eur J Immunol* 27: 2426-2435
109. Tan MCAA, Jordens R, Geluk A, Roep BO, Ottenhoff T, Drijfhout JW, Koning F (1998) Strongly increased efficiency of altered peptide by mannosylation. *Int Immunol* 10 (9): 1299-1304
110. Taylor RS, Baasgaard O, Hammerberg C, Cooper KD (1991) Hyperstimulatory CD1a+CD1b+CD36+ Langerhans cells are responsible for increased autologous T lymphocyte activity to lesional epidermal cells of patients with atopic dermatitis. *J Immunol* 147: 2794-3802
111. Toews GB, Bergstresser PR, Steilein JW (1991) Epidermal Langerhans cells density determines whether contact hypersensitivity or unresponsiveness follows skin painting with DNFB. *J Immunol* 124: 445-453
112. Wang B, Rieger A, Kilgus O, Ochiai K, Mauerer D, Födinger D, Kinet JP, Stingl G (1992) Epidermal Langerhans cells from normal human skin bind monomeric IgE via Fc ϵ RI. *J Exp Med* 175: 1353-1365
113. Watts C, Marsh M (1992) Endocytosis: what goes in and how? *J Cell Sci* 103:1-8
114. West MA, Bretscher MS, Watts C (1989) Distinct endocytic pathways in EGF-stimulated human carcinoma A431 cells. *J Cell Biol* 109: 2731-2739
115. Wolff K (1972) The Langerhans cell. Mali JWH (ed) *Current problems in dermatology*, Karger, Basel, S. 79-145

116. Wollenberg A, de la Salle H, Hanau D, Liu FT, Bieber T (1993) Human keratinocytes release the endogenous β -galactoside-binding soluble lectin immunoglobulin E (IgE-binding protein) which binds to Langerhans cells where it modulates their binding capacity for IgE glycoforms. *J Exp Med* 178:777-785
117. Wollenberg A, Kraft S, Hanau D, Bieber T (1996) Immunomorphological and ultrastructural characterisation of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema. *J Invest Dermatol* 106: 446-453
118. Wollenberg A, Wen S, Bieber T (1999) Phenotyping of epidermal dendritic cells: clinical applications of a flow cytometric micromethod. *Cytometry* 37: 147-155
119. Wollenberg A, Schuller E (1998) Langerhans-Zellen und Immunantwort. In: *Fortschritte der Dermatologie und Venerologie 1998*. Plewig G, Wolff H (Hrsg.), Springer, Berlin, S. 41-48
120. Wu K, Yuan J, Lasky LA (1996) Characterization of a novel member of the macrophage mannose receptor type C lectin family. *J Biol Chem* 271: 21323-21330
121. Vercelli D, Jahara HH, Arai K-I, Geha RS (1989) Induction of human IgE synthesis requires interleukin 4 and T/B cell interactions involving the T cell receptor/CD23 complex and MHC class II antigens. *J Exp Med* 169: 1295-1307

7 Anhang

7.1 Rezepte für Reagentien

7.1.1 Reagentien für die APAAP-Färbung

7.1.1.1 TRIS-Puffer

A. Stammlösungen

TRIS-Base (Trizma-Base)	60,55 g
NaCl	87.66 g
0,5 M Lösung	
Aqua dest.	2600ml

1. Lösung: Zur Herstellung der ersten Lösung wurde die TRIS-Base (Dako, Kopenhagen, Dänemark) in 600ml Aqua dest. (Klinikapotheke der LMU) gelöst und der pH-Wert mit 25% HCl (Klinikapotheke der LMU) auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung mit Aqua dest. auf 1000ml aufgefüllt und die 0,5 M Lösung (Klinikapotheke der LMU) hinzugegeben.

2. Lösung: Zur Herstellung der zweiten Lösung wurde das NaCl (Klinikapotheke der LMU) in 1000ml Aqua dest. gelöst.

B. Gebrauchslösung

Lösung 1	100ml
Lösung 2	100ml
Aqua dest.	800ml

Es ergaben sich 1000ml TRIS-Lösung, welche mit 2 M HCl auf einen pH-Wert von 7,4-7,6 eingestellt wurden.

7.1.1.2 Rabbit-anti-Mouse-Brückenantikörper (R-a-M)

Inaktiviertes Humanserum	250µl
RPMI-Medium	5ml
R-a-M	200µl

Zur Herstellung der gebrauchsfertigen Lösung des Rabbit-anti-Mouse-Brückenantikörpers, R-a-M (Dako, Kopenhagen, Dänemark), wurden 250µl inaktiviertes Humanserum (hergestellt in der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München, inaktiviert durch Erhitzen auf 56°C für sechs bis sieben Minuten) in 5ml RPMI-Medium (Seromed, Berlin) verdünnt. Von dieser Lösung wurden 3800µl mit 200µl R-a-M gemischt und der pH-Wert mit 0,1 M HCl (Klinikapotheke der LMU) eingestellt.

7.1.1.3 APAAP

APAAP	50µl
RMPI-Medium	2450µl

Es wurde APAAP (IgG1, Dako, Kopenhagen, Dänemark) mit dem RMPI-Medium (Seromed, Berlin) vermischt und vor Gebrauch die pH-Farbe mit 0,1 M HCl eingestellt.

7.1.1.4 Entwicklungslösung

Lösung A:

NaCl	8,7g
TRIS-HCl	1,5g
TRIS-Base	4,9g
Propandiol	21g
Levamisol	100mg
Aqua dest.	2000ml

Vorratspuffer: Zur Herstellung des Vorratspuffers wurden NaCl, TRIS-HCl (Dako, Kopenhagen, Dänemark), und die TRIS-Base (Dako, Kopenhagen, Dänemark), in 1000ml Aqua dest. gelöst.

Propandiollösung: Es wurde das Propandiol (Klinikapotheke der LMU) in 1000ml Aqua dest. gelöst.

Zur Herstellung der Lösung A wurden 175ml Vorratspuffer mit 62,5ml Propandiol gemischt und der pH-Wert auf 9,75 eingestellt. Sodann wurde das Levamisol (Sigma, Deisenhofen) dazugegeben.

Lösung B:

Natriumnitrit	50,0mg
Astralfuchsin	0,5ml
Aqua dest.	1,25ml

Zur Fertigstellung der Lösung B wurden Natriumnitrit (Merck, Ismaning), Aqua dest. und Astralfuchsin (Merck, Ismaning) eine Minute lang miteinander reagieren gelassen. Das Astralfuchsin wurde im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt, 5% Neufuchsin (Merck, Ismaning) in 2N HCl, entsprachen 5g in 100ml HCl.

Lösung C:

N-AS-Bi-Phosphat	125,0mg
Dimethylformamid	1,25ml

Das N-AS-Bi-Phosphat (Sigma, Deisenhofen) und Dimethylformamid (Merck, Ismaning) wurden miteinander gemischt.

Erst unmittelbar vor Gebrauch wurde die Entwicklungslösung hergestellt, da sie bei Aufbewahrung ihre Wirkung verliert. Es wurden die Lösungen A, B und C zusammengegeben, der pH-Wert auf 8,7 eingestellt und die fertige Entwicklungslösung durch ein Sterilfilter (Schleicher und Schuell, Dassel) doppelt filtriert.

7.1.2 Puffer und Lösungen für die Phänotypisierung und die Endozytose

7.1.2.1 RPMI-Waschmedium

RPMI ohne Glutamin	500ml	4°C
L-Glutamin	5ml	-20°C
Antibiotikum/Antimykotikum	5ml	-20°C
inaktiviertes FCS	50ml	-20°C

Alle Inhaltsstoffe, das L-Glutamin (Gibco, Karlsruhe), das Fetale Kälberserum (FCS, Boehringer, Mannheim) und das Antibiotikum/Antimykotikum (Gibco, Karlsruhe) wurden bei den angegebenen Temperaturen gelagert und über ein steriles 0,2µm Bottletop-Filter (Pall-Gelman Sciences, Roßdorf) dem RMPI (Seromed, Berlin) hinzugefügt.

Kulturmedium mit FCS

DMEM	500ml	4°C
1 M HEPES Puffer	10ml	4°C
NEAA	5ml	4°C
Na-Pyruvat	5ml	4°C
L-Vitamin	5ml	-20°C
L-Glutamin	5ml	-20°C
Antibiotikum/Antimykotikum	5ml	-20°C
inaktiviertes FCS	50ml	-20°C

Alle Inhaltsstoffe, der einmolare HEPES Puffer (Gibco, Karlsruhe), die nicht essentiellen Aminosäuren (NEAA, Gibco, Karlsruhe), das Natrium-Pyruvat (Merck, Ismaning), Das L-Vitamin (Gibco, Karlsruhe), das L-Glutamin (Gibco, Karlsruhe), das inaktivierte fetale Kälberserum (FCS, Boehringer, Mannheim) und das Antibiotikum/Antimykotikum (Gibco, Karlsruhe) wurden über ein steriles 0,2µm Bottletop-Filter (Pall-Gelman-Sciences, Roßdorf) zu dem Dimethylethylendiamin (DMEM, Merck, Ismaning) hinzugegeben.

7.1.2.2 Monozyten-Waschmedium

bovines Albumin	5,0g
1 M EDTA-Lösung	0,85ml
NaCl	4,5g
Aqua bidest.	ad 500ml

Es wurde aus dem bovinen Albumin (Sigma, Deisenhofen), der einmolaren EDTA-Lösung (Klinikapotheke der LMU), dem Natriumchlorid (Klinikapotheke der LMU) und dem Aqua bidest. das gebrauchsfertige Monozyten-Waschmedium hergestellt. Die Lösung wurde über ein 0,2µm Bottletop-Filter steril filtriert.

7.1.2.3 Monozyten-Kulturmedium

RPMI 1640	500ml	4°C
GM-CSF, 500U/ml	4,5µl	-20°C
IL-4, 13, 500U/ml	10µl	-20°C
L-Glutamin	10ml	-20°C
Antibiotikum/Antimykotikum	5ml	-20°C
Inaktiviertes FCS	50ml	-20°C

Alle Inhaltsstoffe, das GM-CSF (Leucomax von Sandoz, Basel, Schweiz), das Interleukin 4 (IL-4, Gibco, Paisley, Schottland), das L-Glutamin (Gibco, Karlsruhe), das inaktivierte fetale Kälberserum (FCS, Boehringer, Mannheim) und das Antibiotikum/Antimykotikum (Gibco, Karlsruhe) wurden über ein steriles 0,2µm Bottletop-Filter (Pall-Gelman Sciences, Roßdorf) dem RPMI (Seromed, Berlin) zugefügt.

7.1.2.4 Inaktiviertes fetales Kälberserum, FCS

Das fetale Kälberserum (Boehringer, Mannheim) wurde bei -20°C gelagert. Zum Gebrauch wurden 500ml FCS über Nacht im Kühlschrank auftauen gelassen und im Wasserbad bei 56°C inaktiviert.

7.1.2.5 Leukozyten-Wachstumsfaktor, GM-CSF

Die Stammlösung des GM-CSF (Leucomax von Sandoz, Basel, Schweiz) in einer Konzentration von 1670U/µl wurde bei -80°C aufbewahrt. Um die Gebrauchslösung herzustellen wurde die Stammlösung mit sterilem PBS ohne Acid im Verhältnis 1:10 verdünnt und anschließend bei -20°C eingefroren. Es wurden 3µl der Gebrauchslösung entsprechend einer Konzentration von 500U/µl zu einer Million Zellen in einem Milliliter Kulturmedium hinzupipettiert.

7.1.2.6 Interleukin 4, IL-4

Das Interleukin 4 (Gibco, Paisley, Schottland) wurde bei -80°C aufbewahrt. Zur Herstellung der Gebrauchslösung wurde es in 100µl Aqua dest. resuspendiert. Es ergab sich dabei eine Konzentration von 250U/µl. Von der Gebrauchslösung wurden jeweils 2µl zu einer Million Zellen in einem Milliliter Kulturmedium hinzupipettiert. In einem Milliliter Kulturmedium befanden sich somit 500U des Interleukin 4.

7.1.2.7 0,5% Trypsin-Lösung

PBS def.	1000ml	4°C
Trypsin (Typ XI)	5g	-20°C

Die Lösung aus Trypsin (Sigma, Seisenhofen) und sterilem PBS wurde auf dem Magnetrührer gelöst, bis sie klar war. Sodann wurde der pH-Wert mit HCl/NaOH (Klinikapotheke der LMU) auf 7,2-7,4 eingestellt und die Lösung mit einem 0,2µm Bottletop-Sterilfilter steril filtriert. Sie wurde in 50ml-Röhrchen bei -20°C aufbewahrt.

7.1.2.8 0,1% DNase-Lösung

PBS def.	250ml	4°C
bovine DNase (Typ IV)	250mg	-20°C

Es wurde die bovine DNase (Sigma, Deisenhofen) dem sterilen PBS zugegeben. Die Lösung wurde nach ihrer Fertigstellung über ein 0,2µm Bottletop-Sterilfilter steril filtriert und bei -20°C aufbewahrt.

7.1.2.9 PBS def.

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

Das fertige Reagenz (alle Inhaltsstoffe wurden aus der Klinikapotheke der LMU bezogen) wurde mit HCl und NaOH auf einen pH-Wert zwischen 7,2 und 7,4 eingestellt und anschließend autoklaviert.

7.1.2.10 Unsteriler PBS

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

Das fertige Reagenz (alle Inhaltsstoffe aus der Klinikapotheke der LMU) wurden mit HCl und NaOH auf einen pH-Wert zwischen 7,2 und 7,4 eingestellt.

7.1.2.11 Zehnfacher FACS-Puffer

NaCl	170g
Na ₂ HPO ₄	21,4g
NaH ₂ PO ₄	7,8g
Aqua dest.	ad 1500ml
inaktiviertes FCS	200ml
Na-acid	20g

Es wurde der Puffer aus den angegebenen Inhaltsstoffen (FCS Boehringer, Mannheim, die übrigen aus der Klinikapotheke der LMU) hergestellt. Der pH-Wert dieser Lösung wurde mit HCl/NaOH auf 7,2-7,4 eingestellt, anschließend wurde Aqua dest. ad 2000ml aufgefüllt. Der fertige zehnfache FACS-Puffer wurde bei 4°C gelagert. Für die Rückverdünnung zum Gebrauch wurde die Flasche auf dem Magnetrührer erwärmt, bis der Bodensatz vollständig gelöst war und anschließend je 50ml der konzentrierten Lösung mit 450ml Aqua dest. rekonstruiert. Der fertige Puffer wurde durch ein 0,2µm Filter steril filtriert.

7.1.3 Antikörper und Stoffe für die Phänotypisierung, die Pinozytose und die Rezeptor-vermittelte Endozytose

7.1.3.1 Der rezeptor-spezifische Antikörper D547

1mg des Antikörpers (freundlicherweise von A.Lanzavecchia, Basel, Schweiz, zur Verfügung gestellt) wurde in 1ml PBS def. gelöst. Von dieser Stammlösung wurden jeweils 10µl mit 190µl sterilem PBS auf eins zu zwanzig verdünnt, der Antikörper lag somit in einer Endkonzentration von 50µg/ml vor. Die fertigen Eppendorf-Caps wurden bei -20°C gelagert.

7.1.3.2 Antikörper MOPC-21 als Isotypkontrolle für die APAAP-Färbung

1mg des Antikörpers MOPC-21 (IgG1, Sigma, Deisenhofen) wurde in 1ml sterilem PBS gelöst. Um eine Endkonzentration von 10µg/ml zu erreichen, wurde die Stammlösung mit sterilem PBS auf eins zu einhundert verdünnt. Die Eppendorf-Caps wurden anschließend bei -20°C gelagert.

7.1.3.3 Antikörper IgG1 als Isotypkontrolle für die Phänotypisierung

1mg des Antikörpers IgG1 (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) wurde in 1ml sterilem PBS verdünnt. Um eine Endkonzentration von 50µg/ml zu erreichen, wurde die konzentrierte Lösung mit sterilem PBS auf eins zu zwanzig verdünnt. Die fertigen Eppendorf-Caps wurden anschließend bei -20°C aufbewahrt.

7.1.3.4 Sekundärantikörper GaM-FITC

Der Antikörper GaM-FITC (Jackson, Westgrove, PA, USA) wurde in sterilem PBS gelöst, wobei eine Konzentration von 1000µg/ml erreicht wurde. Um eine Endkonzentration von 50µg/ml zu erhalten, wurde die Stammlösung mit sterilem PBS auf eins zu zwanzig verdünnt. Die Eppendorf-Caps wurden anschließend bei -20°C gelagert.

7.1.3.5 Maus-Serum

Das Maus-Serum (Dianova, Hamburg) wurde mit sterilem PBS auf eins zu 30 verdünnt und bei -4°C gelagert.

7.1.3.6 Dextran-FITC

Es wurden 10mg des Farbstoffes Dextran-FITC (MoBiTec, Göttingen) in 1ml sterilem PBS gelöst. Um eine Endkonzentration von 1mg/ml zu erhalten, wurden 10µl dieser Lösung in 90µl sterilem PBS verdünnt, die fertigen Eppendorf-Caps wurden bei -20°C aufbewahrt.

7.1.3.7 Mannan

Das Mannan (MoBiTec, Göttingen) wurde mit sterilem PBS auf eine Konzentration von 1,0mg/ml verdünnt und jeweils á 100µl in Eppendorf-Caps aliquotiert. Es wurde bei -20°C gelagert.

7.1.3.8 Lucifer Yellow

Es wurden 25mg des Farbstoffes Lucifer Yellow (MoBiTec, Göttingen) in 1ml sterilem PBS gelöst. Um eine Endkonzentration von 2,5mg/ml zu erhalten, wurden 10µl dieser Lösung in 90µl sterilem PBS verdünnt, die fertigen Eppendorf-Caps wurden bei -20°C aufbewahrt.

7.1.3.9 CD1a-Premix

T6RD1, PE-konjugiert	30µl
7AAD	20µl
PBS steril/Acid	450µl

In der sterilen Werkbank wurden der an den fluoreszierenden Farbstoff PE gebundene CD1a-Antikörper T6RD1 (IgG1, Coulter, Krefeld), der DNA-Farbstoff 7AAD (Sigma, Deisenhofen) und die PBS-Lösung gemischt. Die entstandenen 500µl des Farbstoffgemisches wurden auf 20 Eppendorf-Caps á 25µl verteilt und bei -20°C gelagert. Die Lösung wurde unverdünnt angewendet.

7.1.3.10 CD14-Premix

Leu-M3, PE-konjugiert	120µl
7AAD	8µl
PBS steril/Acid	72µl

In der sterilen Werkbank wurden der an den fluoreszierenden Farbstoff PE gebundene CD14-Antikörper Leu-M3 (IgG2b, Beckton Dickinson, San Jose, CA, USA), der DNA-Farbstoff 7AAD (Sigma, Deisenhofen) und das acidhaltige PBS gemischt. Die entstandenen 200µl des Farbstoffgemisches wurden auf 20 Eppendorf-Caps á 10µl verteilt und bei -20°C gelagert. Die Lösung wurde unverdünnt angewendet.

7.1.3.11 IgG1-Premix

IgG1RD1	6 μ l
7AAD	4 μ l
PBS steril/Acid	90 μ l

In der sterilen Werkbank wurden der an den fluoreszierenden Farbstoff PE gebundene unspezifische Antikörper IgG1RD1 (Coulter, Krefeld), der DNA-Farbstoff 7AAD (Sigma, Deisenhofen) und das acidhaltige PBS gemischt. Die entstandenen 100 μ l des Farbstoffgemisches wurden auf 10 Eppendorf-Caps á 10 μ l verteilt und bei -20°C gelagert. Die Lösung wurde unverdünnt angewendet.

7.2 Verzeichnis der Abkürzungen

AB	Antibiotikum
7-AAD	7-Amino-Acetinomycin D
AM	Antimykotikum
APAAP	alkaline Phosphatase antialkaline Phosphatase
APC	antigenpräsentierende Zelle
APL	Altered peptide ligand
Dx-FITC	Dextran-Fluoreszenzisothiocyanat
EH	entzündete Haut
FSC	forward scatter, Vorwärtslichtstreuung
GM-CSF	Granulozyten/Monozyten-Kolonie stim. Faktor
IDEC	Inflammatorische Dendritische Epidermale Zelle
IL-2, -4, -5	Interleukin 2, 4, 5
IFN α , γ	Interferon α , γ
LC	Langerhans-Zelle
LPS	Lipopolysaccharid
LY	Lucifer Yellow
MBP	mannosebindendes Protein
MFI	mittlerer Fluoreszenzindex
MLR	mixed leucocyte reaction
MoDC	aus Monozyten kultivierte dendritische Zelle
MR	Mannoserezeptor
NEAA	nicht essentielle Aminosäuren
PBS	phosphatgepufferte NaCl-Lösung
PE	Phycoerythrin
R-a-M	Rabbit-anti-Mouse
rFI	relativer Fluoreszenzindex
SSC	side scatter, Seitwärtslichtstreuung
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α

8 Danksagung

Mein Dank gilt allen, die diese Arbeit ermöglicht und unterstützt haben.

Zunächst danke ich Herrn Professor Dr. med. Dr. h. c. Gerd Plewig für die Bereitstellung der großzügigen Arbeitsmöglichkeiten in der Klinik.

Ich danke Herrn PD Dr. med. Andreas Wollenberg für die Überlassung des Themas und die sehr gute Betreuung während der praktischen Versuche. Er war stets sehr am Fortgang der Arbeit interessiert und er war jederzeit bereit, mir Fragen zu beantworten und Ergebnisse zu besprechen. Durch dieses herausragende Engagement hat er den zügigen Abschluß dieser Arbeit möglich gemacht, und es gebührt ihm hierfür mein besonderer Dank.

Für die freundliche Überlassung von Proben und Reagentien danke ich dem Institut für Rechtsmedizin der Universität München, dem Operations-Team der Dermatologischen Klinik der Universität sowie Herrn Prof. Dr. med. Antonio Lanzavecchia, Basel.

Ich danke allen meinen Kolleginnen und Kollegen, ob Mitdoktoranden oder Ärzte, für ihre Hilfsbereitschaft und die nette und kameradschaftliche Atmosphäre, die während unserer gemeinsamen Arbeit im Labor stets herrschte.

Im Einzelnen möchte ich vor allem folgenden Kolleginnen und Kollegen namentlich danken: Frau Dr. med. Erika Schuller für die Einarbeitung in die praktische Tätigkeit im Labor und ihre ständige Hilfsbereitschaft, Frau Sandra Günther für das gemeinsame Erarbeiten vieler Grundlagen der täglichen Laborarbeit sowie Herrn Dr. med. Tilmann Oppel, der mir beim Erstellen der Graphiken und bei der statistischen Auswertung hilfreich zur Seite stand. Herr PD Dr. med. Christian Sander fertigte die Photographien der APAAP-Färbungen an, hierfür sei ihm herzlich gedankt.

Mein Dank gilt auch den Assistentinnen im Labor für Serologie, Frau Susanne Multhaupt, Frau Dagmar Nau, Frau Margit Orthgiess und Frau Ingrid Urban, für ihre Hilfsbereitschaft bei der Arbeit am Durchflußzytometer.

Ich danke allen, die mich in der Zeit meines Studiums und während meiner Dissertation begleitet haben, auf deren Hilfe und Unterstützung ich mich stets verlassen durfte, im Besonderen danke ich meiner Familie.

9 Lebenslauf

Name	Eva-Maria Schottdorf
Geburtsdatum	24.11.1974
Geburtsort	München
Schule	
1981-1985	Grundschule Neusäß-Westheim
1985-1993	Gymnasium bei St. Anna, Augsburg
1993-1994	Elsa-Brandström-Gymnasium, München
Hochschule	
10.1994-02.1995	Studium der Medizin an der Leopold-Franzens-Universität Innsbruck
04.1995-03.1996	Studium der Medizin an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt/Main
04.1996-09.2001	Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Examina	
25.03.1997	Ärztliche Vorprüfung in München
24.03.1998	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in München
12.04.2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in München
22.05.2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in München
Praktisches Jahr	
24.04.2000- 13.08.2000	Pathologie, Pathologisches Institut der Universität München
14.08.2000- 08.10.2000	Herz- und Thoraxchirurgie, Groote Schuur Hospital, Kapstadt
09.10.2000- 03.12.2000	Abdominalchirurgie und Traumatologie, Groote Schuur Hospital, Kapstadt
04.12.2000- 25.03.2001	Innere Medizin, Hämatologie-Onkologie, Krankenhaus München-Schwabing
Ärztin im Praktikum	
01.07.2001- 07.10.2001	Allgemeinchirurgie, Klinikum Freising
Seit dem 08.10.2001	Strahlentherapie und Radioonkologie, Ludwig-Maximilians-Universität München